

**EFEITOS DOS DIFERENTES TEMPOS DE INÍCIO DE TREINAMENTO  
FÍSICO APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO SOBRE A FUNÇÃO  
CARDÍACA E O REMODELAMENTO VENTRICULAR ESQUERDO EM  
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**Erick Roberto Gonçalves Claudio**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**VITÓRIA-ES, MAIO DE 2017.**

ERICK ROBERTO GONÇALVES CLAUDIO

**EFEITOS DOS DIFERENTES TEMPOS DE INÍCIO DE TREINAMENTO  
FÍSICO APÓS O INFARTO DO MIOCÁRDIO SOBRE A FUNÇÃO  
CARDÍACA E O REMODELAMENTO VENTRICULAR ESQUERDO EM  
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu

**VITÓRIA**

**2017**

Claudio, Erick Roberto Gonçalves, 1982

Efeitos dos diferentes tempos de início do treinamento físico sobre a função cardíaca e o remodelamento ventricular esquerdo em ratas ovariectomizadas. Vitória – 2017.

xviii, 101 p., (UFES, D.Sc., Ciências Fisiológicas, 2017)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues Abreu

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Ovariectomia. 2. Infarto do Miocárdio. 3. Exercício Físico. 4. Função Cardíaca. 5. Remodelamento.

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DO CANDIDATO AO  
TÍTULO DE DOUTOR PELO PPGCF/CCS/UFES**


Nº Matrícula do<sup>(a)</sup> Candidato<sup>(a)</sup>: 2012141590

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada **"Efeitos do tempo de início de treinamento físico após o infarto do miocárdio sobre a função cardíaca e remodelamento ventricular esquerdo em ratas ovariectomizadas"**, apresentada e defendida publicamente pelo aluno **Erick Roberto Gonçalves Cláudio**, no dia 12 de maio de 2017, às 14h00, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

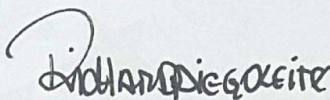
Vitória – ES, 12 de maio de 2017.



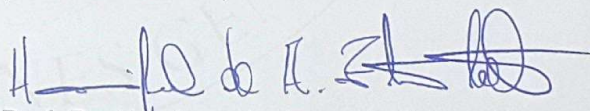
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu  
(Orientadora)



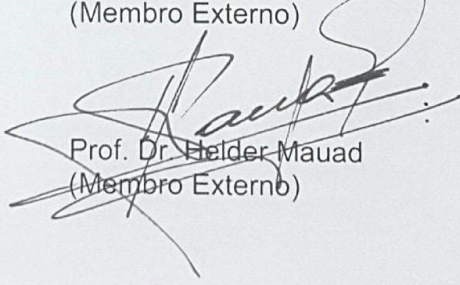
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa  
(Membro Interno)



Prof. Dr. Richard Diego Leite  
(Membro Externo)



Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto  
(Membro Externo)



Prof. Dr. Helder Mauad  
(Membro Externo)

### **DEDICO ESTE TRABALHO**

*À minha esposa Adriana, às minhas filhas Sofia e Beatriz, a minha mãe, a toda minha família, aos meus amigos, a todos que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em nossas vidas.

À minha família, minha esposa Adriana, pelo seu amor, carinho, confiança e também pelo seu apoio incondicional em tudo, e minhas princesinhas, Sofia e Beatriz, simplesmente por existirem em nossas vidas e por nos ensinarem o verdadeiro significado da palavra amor.

À minha mãe Silvana, por todo amor, educação e sabedoria que me concede, além do apoio e incentivo em tudo o que faço na vida.

À toda minha família, em especial minha irmã, meus sobrinhos, meu cunhado, meu pai, que mesmo de longe sempre torcem por mim em todos os meus projetos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Glaucia Rodrigues de Abreu, por todas as oportunidades, por sua confiança, pelo seu conhecimento e por acreditar em mim e apoiar o meu ingresso na pós-graduação, mesmo sem motivo.

Ao meu amigo Divanei dos Anjos Zaniqueli pelo grande incentivo ao meu ingresso na pós-graduação, e por acreditar no meu potencial.

À minha amiga Simone e ao meu amigo Fabrício, um agradecimento muito especial pelos anos de convivência e por toda ajuda, pelo apoio e discussões produtivas para a realização desse e de outros trabalhos.

À todos meus amigos de laboratório, Mariana, Patrick, Cíntia, Renata, Walckiria, Vinícius, Suelen, Laís, Sandra e Demétrius, por toda ajuda e apoio, pelo conhecimento, e também pelos ótimos momentos juntos durante esses longos anos.

À Prof. Dra. Margareth Ribeiro Moysés, ao Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos e a todos seus alunos do laboratório de reatividade vascular coronariana pela parceria, por toda ajuda, por disponibilizar o laboratório para nossos experimentos, e também por me permitirem participar das discussões dos seminários, os quais me acrescentaram muito em conhecimento durante esses anos.

À Prof. Dra. Nazaré Souza Bissoli, a Prof. Sônia Alves Gouvêa e aos alunos do laboratório de hipertensão experimental, pela parceria, pelo apoio, pelo conhecimento e por todo auxílio em muitos momentos.

Ao Prof. Jones Bernardes Graceli e aos seus alunos Priscila e Eduardo pela execução das análises histológicas.

À todos os alunos de iniciação científica do laboratório (não vou citar nomes), sem vocês esse trabalho não seria possível.

À todos os meus amigos, que estão sempre torcendo por mim, mesmo que distantes.

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja  
toda a escada. Apenas dê o  
primeiro passo”.*

*Martin Luther King Jr.*

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 – Objetivo Geral.....	41
2.2 – Objetivos Específicos.....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 – Animais Experimentais.....	43
3.2 – Ovariectomia.....	43
3.3 – Indução do Infarto do Miocárdio.....	44
3.4 – Grupos Experimentais.....	45
3.5 – Protocolo de Treinamento Físico.....	46
3.6 – Avaliação da Função Cardíaca.....	47
3.7 – Coleta dos Tecidos para Pesagem, Medição e Armazenamento.....	49
3.8 – Estudo da Expressão Proteica.....	49
3.8.1 – Western Blotting para Detecção da Expressão Proteica.....	49
3.8.2 – Extração, Quantificação de Proteínas e Preparo das Amostras.....	50
3.8.3 – Eletroforese e Transferência das Amostras.....	51
3.8.4 – Bloqueio e Incubação com os Anticorpos Primários e Secundários...51	
3.8.5 – Detecção das Proteínas.....	52
3.9 – Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase.....	53
3.10 – Atividade Enzimática da Catalase.....	53
3.11 – Detecção “ <i>in situ</i> ” da Produção Cardíaca de Superóxido.....	54



3.12 – Avaliação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica.....	54
3.13 – Análises Histológicas.....	55
3.14 – Atividade da Enzima Citrato Sintase.....	56
3.15 – Análise Estatística.....	57
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1 – Peso Corporal e Adiposidade.....	58
4.2 – Taxa de Sobrevida, Efetividade da Ovariectomia e do Treinamento Físico.....	58
4.3 – Extensão do Infarto do Miocárdio.....	60
4.4 – Hemodinâmica e Função Cardíaca.....	61
4.5 – Avaliação do Colágeno Intersticial e Hipertrofia do Miócito Cardíaco....	63
4.6 – Avaliação do Estresse Oxidativo Cardíaco.....	65
4.7 – Expressão Proteica.....	68
4.8 – Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	71
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efeitos cardioprotetores do estrogênio mediante a ativação de seus receptores.....	21
<b>Figura 2:</b> Remodelamento ventricular esquerdo após o infarto do miocárdio.....	25
<b>Figura 3:</b> Hipertrofia e dilatação ventricular e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca sistólica e diastólica após o infarto do miocárdio.....	31
<b>Figura 4:</b> Mecanismos responsáveis pela liberação de Angiotensina-II e ativação do receptor AT-1R após o infarto do miocárdio.....	32
<b>Figura 5:</b> Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio produzidos pelo organismo, associados aos seus efeitos fisiológicos, quando em baixas concentrações, e aos seus efeitos patológicos em um estado de estresse oxidativo.....	34
<b>Figura 6:</b> Principais vias de formação das espécies reativas de oxigênio no miocárdio isquêmico e as principais enzimas do sistema antioxidante.....	35
<b>Figura 7:</b> Mecanismo de indução da fibrose intersticial no tecido cardíaco após o infarto do miocárdio, estimulado pela Angiotensina-II pela ativação do AT-1R e pelo aumento do estresse oxidativo mediado pelo complexo da NADPH oxidase.....	37
<b>Figura 8:</b> Ilustração da indução do infarto do miocárdio, demonstrando a localização proximal do ponto de oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda.....	45
<b>Figura 9:</b> Divisão do grupos experimentais.....	46
<b>Figura 10:</b> Desenho do protocolo experimental.....	47
<b>Figura 11:</b> Curva de pressão ventricular demonstrando os pontos onde foram obtidas as variáveis.....	48
<b>Figura 12:</b> Avaliação da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo dos animais após 8 semanas de treinamento físico.....	60
<b>Figura 13:</b> Área de infarto cardíaca após o treinamento físico durante 8 semanas.....	61
<b>Figura 14:</b> Avaliação funcional do ventrículo esquerdo após 8 semanas de treinamento físico.....	63
<b>Figura 15:</b> Avaliação da deposição de colágeno intersticial após o final do período de treinamento físico.....	64

<b>Figura 16:</b> Avaliação da área de secção transversa dos miócitos cardíacos após o final do período de treinamento físico.....	65
<b>Figura 17:</b> Avaliação dos produtos avançados de oxidação proteica no tecido cardíaco.....	66
<b>Figura 18:</b> Avaliação da produção <i>in situ</i> de superóxido no tecido cardíaco mediante a fluorescência ao dihidroetídeo (DHE).....	67
<b>Figura 19:</b> Avaliação da expressão proteica do receptor AT-1R (A) e da enzima pró-oxidante gp91phox (B) no tecido cardíaco de ratas infartadas e submetidas ao treinamento físico.....	69
<b>Figura 20:</b> Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes SOD-1 (A), SOD-2 (B) e catalase (C) no tecido cardíaco de ratas infartadas e submetidas ao treinamento físico.....	70
<b>Figura 21:</b> Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A) e catalase (B) no tecido cardíaco após 8 semanas de treinamento físico.....	71
<b>Figura 22:</b> Resumo dos principais achados do estudo.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros ponderais corporal, uterino, de adiposidade e cardíaco das ratas ovariectomizadas.....	59
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros hemodinâmicos.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**+dP/dt** – Derivada positiva do desenvolvimento de pressão ventricular

**-dP/dt** - Derivada negativa do desenvolvimento de pressão ventricular

**μL** – Microlitro

**μm** – Micrometro

**μmol/L** – Micromol por litro

**AMPK** – Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMP)

**Ang-1-7** – Angiotensina-1-7

**Ang-II** – Angiotensina II

**ANOVA** – Análise de variância

**ANP** – Peptídeo natriurético atrial

**AOPP** – Produtos avançados de oxidação proteica

**AT-1R** – Receptor do tipo 1 da Angiotensina II

**BNP** – Peptídeo natriurético do tipo B

**C** - Celsius

**CAT** – Enzima antioxidante catalase

**DAC** – Doença arterial coronariana

**DCV** – Doenças cardiovasculares

**DHE** - Dihidroetídeo

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**E2** – 17-β Estradiol

**ECA-1** – Enzima conversora de angiotensina do tipo 1

**ECG** - Eletrocardiograma

**EO** – Estresse oxidativo

**EPM** – Erro padrão da média

**EROS** – Espécies reativas de oxigênio

**FC** – Frequência cardíaca

**g** – Grama (unidade de peso)

**gp91phox** – Isoforma de membrana do complexo da NADPH oxidase (Nox-2)

**GPx** – Glutathione peroxidase

**i.m** - Intramuscular

**i.p** - Intraperitoneal

**IL** – Interleucina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10)

**IM** – Infarto do miocárdio

**IM3+EF** – Grupo que iniciou o treinamento 3 dias após o IM

**IM15+EF** – Grupo que iniciou o treinamento 15 dias após o IM

**JAK** – Proteína quinase ativada pela Janus (do inglês, “Janus-activated protein kinase”)

**kg** - Kilograma

**km/h** – Kilômetros por hora

**M** - Mol

**MEC** – Matriz extracelular

**mg** - Miligrama

**min** - Minuto

**mL** - Mililitro

**mM** - Milimol

**mm** - Milímetro

**MMP** – Metaloproteinases de matriz (do inglês, “matrix metalloproteinases”)

**nm** - Nanômetro

**NOX** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

**OMS** – Organização mundial da saúde

**OVX** - Ovariectomia

**PA** – Pressão arterial

**PAD** – Pressão arterial diastólica

**PAM** – Pressão arterial média

**PAS** – Pressão arterial sistólica

**PC** – Peso corporal

**PCor** – Peso do coração

**PDFVE** – Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

**PSVE** – Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

**SHAM** – Grupo submetido a cirurgia fictícia para a indução do infarto

**SNS** – Sistema nervoso simpático

**SOD** – Enzima antioxidante superóxido dismutase

**s.c.** – Subcutâneo

**SOD-1** – Isoforma citosólica da SOD

**SOD-2** - Isoforma mitochondrial da SOD

**SRA** – Sistema renina-angiotensina

**TGF- $\beta$**  – Fator transformador de crescimento beta

**TIMP** – Inibidor tecidual das metaloproteinases de matriz (do inglês, tissue inhibitor of MMP)

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**UA** – Unidades arbitrárias

**VE** – Ventrículo esquerdo

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos diferentes tempos de início de treinamento físico após a indução do infarto do miocárdio (IM) sobre a função cardíaca e o remodelamento ventricular esquerdo em ratas ovariectomizadas (OVX). Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*) OVX, com 12 semanas de idade e divididas aleatoriamente em 4 grupos: SHAM de infarto (SHAM), infartadas sedentárias (IM), infartadas que iniciaram o treinamento 3 dias após o IM (IM3+EF) e infartadas que iniciaram o treinamento 15 dias após o IM (IM15+EF). O protocolo de treinamento de corrida em esteira de intensidade leve a moderada foi realizado cinco vezes por semana, com duração de 60 min/dia, por um período de oito semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, as ratas foram anestesiadas e submetidas a avaliação dos seguintes parâmetros: i) função do ventrículo esquerdo (VE), onde foram avaliados os parâmetros de pressão sistólica do VE (PSVE), pressão diastólica final do VE (PDFVE) e derivadas positiva e negativa do desenvolvimento de pressão ventricular (+dP/dt e - dP/dt, respectivamente); ii) área de infarto cardíaca; iii) deposição de colágeno intersticial e da hipertrofia do miócito cardíaco por histologia; iv) estresse oxidativo cardíaco pela produção de radical superóxido “*in situ*” mediante a fluorescência ao dihidroetídeo e pela avaliação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP); v) expressão proteica do receptor AT-1 da angiotensina II (AT-1R) e da gp91phox pelo método de western blotting (WB); vi) expressão proteica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD-1 SOD-2) e catalase (CAT), também por WB; vii) análise da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Os resultados demonstram, nos animais que iniciaram o treinamento 3 dias após o IM: i) um aumento da área de infarto; ii) não houve uma melhora da PDFVE; iii) não houveram melhoras nos parâmetros de remodelamento ventricular; iv) houve um aumento na densidade do receptor AT-1R da Ang-II no coração; v) não houve redução do estresse oxidativo cardíaco induzido pelo IM; vi) ocorreu uma redução na expressão da SOD-2 no coração; e vii) não restaurou a redução na atividade enzimática antioxidante da SOD e da catalase induzida pelo IM. Portanto, demonstramos que o treinamento físico iniciado 3 dias após o IM em ratas OVX não foi eficiente em prevenir as alterações relacionadas a deterioração da função cardíaca e o remodelamento adverso do VE. Esses resultados estão associados, principalmente, ao aumento da densidade do AT-1R e do estresse oxidativo cardíaco. Portanto, o tempo de início do treinamento físico após o IM em ratas OVX é um importante fator relacionado a prevenção das alterações induzidas pelo IM e, dessa forma, deve ser levado em consideração para a prescrição de exercícios físicos após o IM em condições de deficiência estrogênica.

**Palavras chave:** Ovariectomia; Infarto do miocárdio; Treinamento físico; Função cardíaca; Remodelamento.



## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of the different time of exercise training (ET) initiation after myocardial infarction (MI) on the cardiac function and the ventricular remodeling in ovariectomized rats (OVX). Twelve-week-old OVX female Wistar rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) were randomly divided into four groups: MI-SHAM (SHAM), MI sedentary (MI), MI which started ET 3 days after MI (MI3+ET) and MI which started ET 15 days after MI (MI15+ET). Low to moderate intensity training protocol in a motorized treadmill was performed during 8 weeks (60 min/d, 5 days/wk). Forty-eight hours after the last training session, animals were anesthetized and subject to evaluation of the following parameters: i) Cardiac function after a catheter insertion in the left ventricle (LV); ii) MI area; iii) collagen deposition and myocyte hypertrophy by histology; iv) myocardial oxidative stress by the “*in situ*” generation of superoxide (DHE) and by the evaluation of the advanced oxidation protein products (AOPP); v) protein expression of type 1 receptor of angiotensin II (AT-1R) and of the membrane isoform of multi-enzymatic complex of NADPH oxidase (gp91phox) by the western blotting (WB) method; vi) antioxidants protein expression, such as superoxide dismutase (SOD-1 and SOD-2) and catalase (CAT), also by WB; vii) antioxidant enzymes activities (SOD and CAT). Eight weeks after ET it was observed in the MI3+ET group: i) there was a higher infarction area; ii) early ET cannot improve the LV end diastolic pressure; iii) there were no improvements in the remodeling parameters; iv) there was an increase in the expression of AT-1R in the cardiac tissue; v) ET initiated early after MI cannot reduces the cardiac oxidative stress induced by MI; vi) it was observed a reduction in the expression of SOD-2, and; vii) ET initiate early cannot restore the reduction in enzymatic activity of both antioxidant enzymes after MI. Therefore, we showed that ET initiated 3 days after MI was not efficient in preventing the deterioration of cardiac function and adverse remodeling. These results were associated with the increase in AT-1R expression and of the higher oxidative stress. Accordingly, the time of ET initiation after MI in OVX rats is an important factor related to the prevention of MI-induced alterations and should be taking into account for the ET prescription after MI in the condition of estrogen deficiency.

**Keywords:** Ovariectomy; Myocardial infarction; Exercise training; Cardiac function; Remodeling.

## 1- INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) configuram-se entre as principais causas de morte no mundo moderno independente do sexo, representando cerca de 17,3 milhões de mortes por ano, e estima-se que esse número aumente para mais de 23,6 milhões no ano de 2030 (Organização Mundial da Saúde (OMS), 2011; Mozzafarian et al., 2015).

Entre as mulheres, as DCV são as principais responsáveis pelas mortes desta população, especialmente naquelas acima de 50 anos de idade (Lobo et al., 2014). De acordo com a I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Fernandes et al., 2008), os dados epidemiológicos apontam que as mortes por DCV, principalmente após o climatério, assumem índices em torno de 53% excedendo, inclusive, aquelas causadas por todos os tipos de câncer (Rosamond et al., 2008; Fernandes et al., 2008).

De fato, a expectativa média de vida das mulheres é relativamente maior quando comparada a média masculina (White, 2002), e o risco de desenvolvimento de DCV aumenta juntamente com o avanço da idade no período pós-menopausa, quando comparado ao período pré-menopausa (Khalil, 2013). Um dos principais motivos para essa diferença parte do pressuposto de que as mulheres no período pré-menopausa têm baixo risco e incidência de DCV, exibindo assim, uma cardioproteção quando comparado aos homens da mesma idade. No entanto, essa proteção é gradualmente perdida após a menopausa, igualando ou inclusive excedendo os riscos observados nos homens (White, 2002; Kang et al., 2011).

Acredita-se que essa diferença entre os períodos pré e pós-menopausa esteja associado principalmente aos efeitos cardioprotetores dos estrógenos (Figura 1).

A menopausa, por sua vez, é definida pela OMS como a cessação permanente da menstruação, resultado da perda da função folicular ovariana ou da remoção cirúrgica dos ovários (ooforiectomia) (Maturana et al, 2007; Sánchez-Rodriguez et al, 2012). A idade de ocorrência natural da menopausa é entre 50 e 52 anos de idade nos países desenvolvidos, enquanto que, em países menos desenvolvidos, ocorre cerca de 3-4 anos antes, sendo, a depleção dos hormônios esteróides sexuais uma consequência natural do envelhecimento e da falência gonadal (Lobo et al., 2014). Nesse sentido, a queda abrupta nas concentrações de estrógenos circulantes (principalmente o  $17\beta$ -Estradiol – E2, que é a forma mais predominante e mais potente dentre os estrógenos), está associada a uma grande variedade de efeitos adversos a saúde feminina, como sintomas vasomotores, atrofia urogenital, prejuízo cognitivo, em conjunto com um aumento no risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como a obesidade, doenças metabólicas, demência, osteoporose, artrite, DCV e cancer (Maturana et al., 2007; Lobo et al., 2014).

Estudos clínicos que avaliaram mulheres no período pós-menopausa, assim como, em modelos experimentais de menopausa que avaliaram os principais fatores de risco tradicionais para o desenvolvimento de DCV, relatam uma série de alterações importantes que exercem um impacto negativo sobre a saúde da mulher, incluindo o aumento na deposição de gordura abdominal, redução na tolerância a glicose, perfil anormal de lipídeos plasmáticos, aumento na pressão arterial e no tônus simpático, disfunção endotelial e inflamação vascular (Rosano et al., 2007).

Dentre esses, o aumento sustentado da pressão arterial (hipertensão) se constitui como um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento da doença arterial

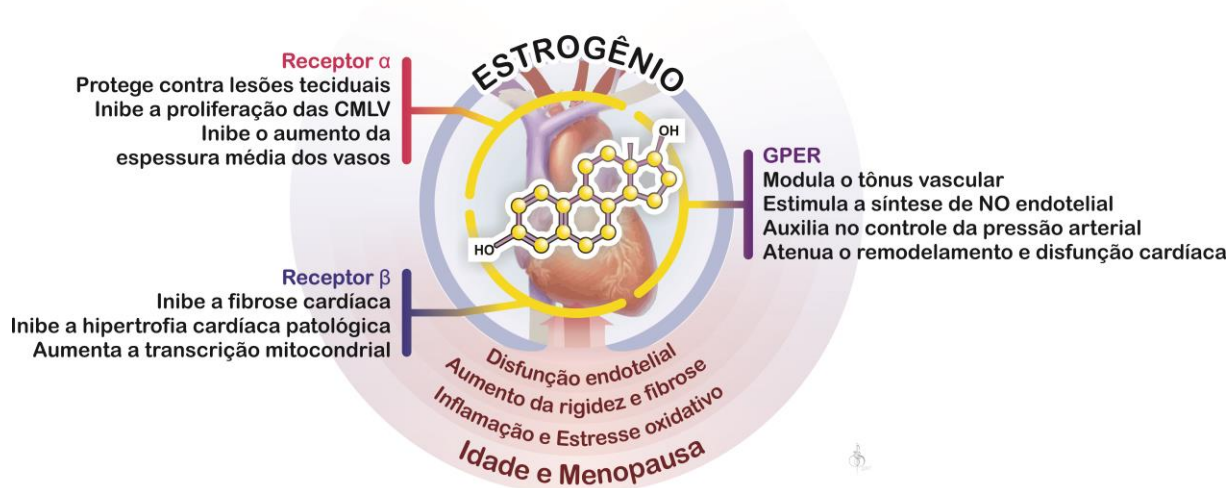
coronariana (DAC), que por sua vez, é a principal DCV responsável por mortes entre mulheres, especialmente após a menopausa. Além disso, quando as mesmas são acometidas por um evento coronariano, exibem um prognóstico menos favorável quando comparadas aos homens (Maturana et al., 2007; Vassale et al., 2009).

Hernandez et al. 2000, em um modelo experimental de menopausa, já chamavam a atenção ao descreverem um aumento significativo da pressão arterial (PA), relacionado com a depleção estrogênica e o tempo decorrido após a cirurgia de ovariectomia (OVX), em que ratas jovens exibiam índices pressóricos maiores do que os controles não operados. No entanto, esses valores imediatamente eram insuficientes para caracterizá-las como hipertensas, mas que associados ao avanço da idade, podem ser um fator preponderante para o desenvolvimento da hipertensão; e tal fato deve ser levado em consideração quando analisamos os efeitos da menopausa juntamente com a deficiência estrogênica.

Recentemente, Ali et al., 2016, avaliaram a associação entre diversos fatores metabólicos com o desenvolvimento de hipertensão em 242 mulheres, demonstrando uma alta prevalência de hipertensão nas mulheres no período pós-menopausa quando comparadas as mulheres na pré-menopausa (72,8% vs. 26%, respectivamente). Esses resultados foram correlacionados ao aumento da circunferência da cintura (índice de obesidade abdominal), à resistência a insulina e à apolipoproteína B.

O aumento na adiposidade corporal também é um fator importante a ser observado, sendo relacionado ao aumento do risco de DAC após a menopausa. A alteração da distribuição de gordura nesse período leva a um aumento na resistência a insulina e incidência de diabetes, fato que eleva substancialmente o risco de DCV e morte (Lobo et al., 2014). Estudos experimentais demonstram que, de fato, a deficiência

estrogênica leva a um aumento substancial na adiposidade. Nesse sentido, Claudio et al. (2013) e Endlich et al. (2013), demonstraram haver um aumento significativo no peso de gorduras de ratas jovens, submetidas a remoção cirurgica dos ovários, principalmente nos coxins retroperitoneal e parametrial, associados a uma redução da vasodilatação dependente do endotélio à bradicinina e a um aumento na vasoconstrição induzida pela angiotensina II (Ang II) no leito vascular coronariano, respectivamente. Em conformidade com esses resultados, estudos em mulheres na pós-menopausa demonstram um aumento da circunferência da cintura (Ali et al., 2016), assim como, um aumento nos depósitos de gordura abdominal, associados a uma redução da massa livre de gordura em mulheres na pré-menopausa, com a supressão dos hormônios ovarianos por meio de um agonista de hormônio liberador de gonadotrofinas (Shea et al., 2015).



**Figura 1:** Efeitos cardioprotetores do estrogênio mediante a ativação de seus receptores. Legenda: CMLV, Células do Músculo Liso Vascular; NO, Óxido Nítrico.

Dentre as DAC, o infarto do miocárdio (IM) é o desfecho clínico mais prevalente no mundo, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade. De acordo com as estatísticas atualizadas da American Heart Association (Mozaffarian et al., 2015), o

número de mulheres americanas diagnosticadas com IM ou DAC fatal é de 35 por 1000, entre as mulheres com idade na faixa etária de 45 à 54 anos; 60 por 1000 entre as com idade de 55 à 64 anos; e 70 por 1000, na idade de 65 à 74 anos, indicando que a prevalência de IM aumenta a partir da idade de início da transição para o período da menopausa, e cresce consideravelmente nos anos subsequentes. Além disso, estima-se que cerca de 26% das mulheres acima de 45 anos irão morrer dentro de um ano após serem acometidas pelo primeiro IM (Mozaffarian et al., 2015). No Brasil, no período entre 1996 e 2003, foram notificadas 532.923 mortes associadas ao IM, e um aumento considerável de 61% no número de internações (Guimarães et al., 2006), resultando em um alto custo para a saúde pública e uma piora na qualidade de vida da população.

De forma geral, as mulheres experimentam seu primeiro IM cerca de 6-10 anos mais tarde do que o homem, atribuindo-se amplamente essa diferença aos efeitos protetores do estrogênio, exercendo um potencial benefício na progressão da doença cardíaca (Pedersen et al., 2016; Piro et al., 2010). Reconhecidamente, esses hormônios contribuem para a melhora de um conjunto de fatores que estão intimamente ligados a um melhor perfil aterogênico, como a redução de lipídeos circulantes, de moléculas pró-inflamatórias, aumento da produção endotelial de óxido nítrico, além de efeitos antioxidantes (Resanovic et al., 2013). Foi demonstrado que mulheres que são submetidas a cirurgia de histerectomia ou a ooforiectomia bilateral antes da menopausa, estão sujeitas a um risco excessivo para o acometimento pelo IM (Falkeborn et al., 2000). Além disso, mulheres que são afetadas por doença cardíaca isquêmica após a menopausa, geralmente exibem um prognóstico pior quando comparadas aos homens (Piro et al., 2010). Resultados de estudos experimentais indicam que a deficiência estrogênica está fortemente

associada a redução da função contrátil. Dessa forma, foi demonstrado em experimentos com músculo papilar isolado em ratas jovens ovariectomizadas uma redução da força contrátil após estimulação com cálcio e com um agonista  $\beta$ -adrenérgico (isoproterenol), sendo esses efeitos dependentes da ativação do receptor AT-1 (AT-1R) da Ang-II (Ribeiro Jr. et al., 2012). Além disso, esses efeitos sobre a função contrátil também foram associados ao aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (EROS), e a alterações na expressão das proteínas responsáveis pelo manejo de cálcio (Ribeiro Jr. et al., 2012; Ribeiro Jr. et al., 2013). Paigel et al., 2011, demonstraram que esses efeitos ocorrem em função do tempo em que os animais ficam privados da exposição ao E2, sendo a disfunção contrátil observada com cerca de sessenta dias após a ovariectomia, e restaurada com a reposição de E2. Nessa mesma linha, foram observados em cardiomiócitos isolados de camundongos (Turdi et al., 2015), que a deficiência estrogênica reduz o pico e a velocidade de encurtamento e relaxamento das células cardíacas, efeitos que foram atenuados pela terapia com E2 mediante a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK). Portanto, de acordo com os resultados dos estudos expostos acima, podemos verificar que a deficiência estrogênica é um fator de grande importância para a redução da função contrátil das células cardíacas, e que explica, parcialmente, o aumento do risco cardiovascular com a ausência dos hormônios ovarianos.

O remodelamento ventricular iniciado após um quadro isquêmico tem por objetivo restaurar a função cardíaca (de Waard et al., 2007), sendo definido como um processo pelo qual fatores mecânicos, neuro-hormonais e possivelmente genéticos após uma lesão cardíaca altera o formato, a dimensão e a função cardíaca (Jessup e Brozena, 2003; Piro et al., 2010). Nesse sentido, ocorre uma série de alterações

de ordem temporal em nível celular, molecular e tecidual ao miocárdio lesionado, o qual predispõe os pacientes ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca se não forem adequadamente tratados, exercendo um impacto significativo sobre a sobrevivência dos pacientes (Mill et al., 2011; Orenstein et al., 1995).

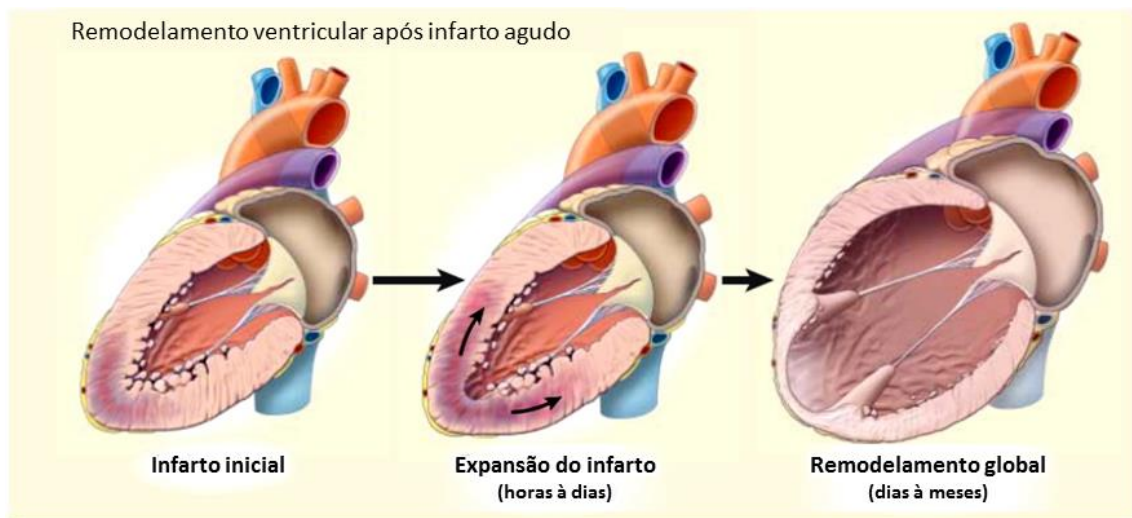
Esse processo tem sido arbitrariamente dividido em fase inicial (dentro de 72 horas), e fase tardia (posterior a 72 horas) (Sutton e Sharpe, 2000). A fase inicial é caracterizada por um período de expansão da zona de infarto, o que pode resultar em ruptura ventricular precoce ou formação de aneurismas, e a fase tardia envolve o ventrículo como um todo e é associado com a progressão da dilatação, com a distorção da forma do ventrículo e hipertrofia mural (Sutton e Sharpe, 2000).

O mecanismo adjacente relacionado ao remodelamento ventricular patológico pós-IM é multifatorial, envolvendo uma grande variedade de reações biológicas no tempo de curso do processo de remodelamento, os quais envolvem: i) isquemia local e morte das células miocárdicas; ii) estresse oxidativo e reações inflamatórias no miocárdio lesionado; iii) reações cardiodepressoras devido a produção de EROS e citocinas inflamatórias; iv) mudanças na matriz extracelular pela ativação das metaloproteinases de matriz (MMP, do inglês “matrix metalloproteinase”); v) mudanças estruturais do miocárdio em resposta ao estresse mecânico, e; vi) síntese de colágeno e fibrose miocárdica (Hori e Nishida, 2009).

As primeiras modificações observadas após a lesão são iniciadas dentro de poucas horas, e se estendem por vários dias, semanas e meses, culminando com uma modificação estrutural e geométrica do coração em decorrência do aumento da carga de trabalho cardíaca (Pontes e Leães, 2004), tornando-o mais esférico, assim como, causando hipertrofia, conforme demonstrado nas figuras 2 e 3 (Jessup e Brozena 2003). A sobrecarga gerada na parede do ventrículo ativa uma cascata de vias de



sinalização bioquímica intracelular, que é responsável por iniciar e modular um processo de mudanças reparativas, o que inclui a dilatação, hipertrofia e a formação de cicatriz de colágeno (Sutton e Sharpe, 2000). Dessa maneira, a extensão do remodelamento do ventrículo esquerdo pode ser um fator preditivo para a morbidade e mortalidade dos pacientes com IM (Gaudron et al., 1993).



**Figura 2:** Remodelamento ventricular esquerdo após o infarto do miocárdio. Adaptado de Jessup e Brozena, 2003.

A oclusão coronariana persistente leva a morte celular do miocárdio, a qual, por sua vez, ocorre tanto por apoptose quanto por necrose, sendo esta última a forma predominante na fase aguda após a oclusão (Konstantinidis et al., 2013). Por outro lado, Palojoki et al., 2001, observaram que existe também uma grande contribuição da apoptose nas primeiras 24 horas após o IM em ratos, tanto na área infartada quanto na zona limítrofe. Além disso, foi observado um aumento contínuo na apoptose do miocárdio remoto a partir do primeiro dia pós-IM até 12 semanas, o que pode culminar com uma redução significativa da capacidade de bombeamento cardíaco (Palojoki et al., 2001). Corroborando esses achados, Sam et al., 2001,

observaram em camundongos, um aumento na apoptose da área remota ao IM no miocárdio de camundongos, que persistiu por até 6 meses após a indução do infarto, sendo a frequência de apoptose relacionada a severidade da disfunção do VE. Sendo assim, a apoptose exerce um grande impacto no processo de remodelamento em direção ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca, como consequência de uma desregulação no balanço de proteínas pró e antiapoptóticas (Bax e Bcl-2, respectivamente) (Takemura e Fujiwara, 2004), tornando a apoptose um importante alvo terapêutico, uma vez que esse processo interfere diretamente sobre a área infartada, o qual é um determinante clássico do remodelamento ventricular e da progressão a insuficiência cardíaca (Mill et al., 2011).

A perda de células miocárdicas após o IM leva a ativação de uma série de fatores neurohormonais, como a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e do sistema renina-angiotensina (SRA) (Guo et al., 2016). O aumento da atividade simpática, de forma aguda, mediante a ativação dos receptores beta adrenérgicos (principalmente  $\beta_1$ ), aumenta a frequência e a contratilidade cardíaca e causa vasoconstrição, de forma a compensar a redução do débito cardíaco, manter a estabilidade hemodinâmica e a perfusão sanguínea sistêmica (Brum et al., 2006; Guo et al., 2016). Dessa maneira, o SNS é ativado precocemente após o IM, sendo que sua hiperatividade está associada com a disfunção contrátil, morte celular, liberação de citocinas e arritmogênese (Mill et al., 2011). Além disso, a exposição crônica do coração a níveis elevados de catecolaminas, liberados dos terminais sinápticos e das glândulas adrenais pode levar a alterações patológicas posteriores, resultando em um aumento contínuo do tônus simpático e uma progressiva deterioração na estrutura e função cardíaca (Brum et al., 2006). Adicionalmente, a Ang-II, que está aumentada após o IM, facilita a atividade do SNS aumentando a síntese e liberação,

e diminuindo a recaptação de catecolaminas nos nervos simpáticos (Saxena, 1992). A importância da ativação do SNS é demonstrada em estudos em que a desnervação simpática é realizada. Nesse sentido, Zanoni et al., 2017, verificaram em ratos infartados que a simpatectomia bilateral atenuou o remodelamento ventricular e preservou a função sistólica, assim como, o estudo de Guo et al., 2016, em que a desnervação renal resultou em uma melhora da função sistólica do VE (fração de ejeção e da fração de encurtamento), da pressão arterial sistólica, além de reduzir a fibrose cardíaca. Ainda, Huang et al., 2007, propuseram que a ativação do SRA central seja um mecanismo preponderante, quando comparado com ativação sistêmica do SRA, associado com a hiperatividade simpática pós-IM, visto que o bloqueio intra-cérebro-ventricular do AT-1R com losartan em ratos infartados previniu a hiperatividade simpática e melhorou a função sistólica e diastólica, além de prevenir a fibrose e o aumento do diâmetro do miócito.

Em ratas ovariectomizadas e infartadas, a sensibilidade do barorreflexo encontra-se alterado, de forma a aumentar a responsividade simpática e reduzir responsividade vagal (Flores et al., 2010). Em relação ao reflexo cardiopulmonar, verifica-se que ele encontra com responsividade mantida agudamente após o IM, porém, tem sua sensibilidade reduzida em um período crônico, com a progressão do remodelamento ventricular (Meyrelles et al., 1997). Portanto, verificamos que a hiperativação do SNS após o IM, facilitado também pelo SRA e associado com a redução da sensibilidade dos reflexos cardiocirculatórios, quando se torna crônico, desencadeia inúmeras alterações cardíacas e hemodinâmicas que culminam com a disfunção cardíaca e exacerbam o processo de remodelamento ventricular.

A partir do momento em que se instala o processo de necrose celular, devido a irreversibilidade do processo isquêmico, observa-se o início precoce do reparo

cardíaco, momento em que são ativados os mecanismos de resposta imune adaptativa. Nessa fase inicial, tem-se a liberação de moléculas quimiotáticas e o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), que migram para o miocárdio lesionado e iniciam a fagocitose das células necrosadas e a degradação do colágeno da matriz extracelular (MEC) para sua posterior regeneração (Mill et al., 2011; Frangogiannis et al., 2012).

Os neutrófilos são responsáveis pela liberação das MMP. Essas proteínas são enzimas dependentes de zinco que regulam a cascata de reparo da lesão cardíaca pela clivagem de substratos da MEC e de outros substratos que não fazem parte da MEC para remover o tecido necrótico e regular a função proteica, respectivamente (Iyer et al., 2016). Atualmente, foram mensuradas 11 isoformas das MMP e 4 inibidores teciduais das MMP (TIMP, do inglês “tissue inhibitor of matrix metaloproteinase) após o IM, destacando-se a isoforma MMP-9, a qual foi extensivamente estudada, e encontra-se elevada durante a primeira semana pós-IM (Iyer et al., 2016). Foi demonstrado que a inibição das isoformas MMP-9 (Iyer et al., 2016) e MMP-12 (Iyer et al., 2015), logo após a indução do IM em camundongos, leva a um retardo na resolução da inflamação, trazendo uma piora da função cardíaca, demonstrando assim, a importância da atividade dessas enzimas para o processo de remodelamento.

Os macrófagos, por sua vez, são responsáveis por realizar a fagocitose do tecido necrosado e pela liberação de diversas citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), as quais irão sinalizar a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, (Mill et al., 2011). Em modelo de infarto em ratos, foi observado um aumento robusto na produção intramiocárdica dessas citocinas, tanto na área infartada, quanto no miocárdio não-infartado (Deten

et al., 2002). Recentemente, Zarrouk-Mahjoub et al., 2016, avaliaram a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-8 e a antiinflamatória IL-10 em pacientes pós-IM no tempo de curso do processo de remodelamento. Os autores observaram um aumento substancial nas citocinas pró-inflamatórias e uma redução significativa da IL-10 nos dias 2 e 30 pós-IM, demonstrando assim, que o desbalanço entre as citocinas pró e antiinflamatórias poderia contribuir para a progressão do remodelamento ventricular e possivelmente levar a insuficiência cardíaca. Entretanto, é importante salientar que o aumento das citocinas precede o aumento local da atividade das MMP na área infartada, assim como, o aumento na concentração dos peptídeos natriuréticos atrial e do tipo B (ANP e BNP, respectivamente), e o aumento da expressão de colágeno na área não-infartada (Deten et al., 2002).

O remodelamento pós-infarto, frequentemente, exibe um aumento na síntese e deposição de colágeno nos espaços intersticiais e perivascular, o que contribui para o prejuízo da função cardíaca (Mill et al., 2011). O crescimento nas células formadoras da MEC e o balanço entre a síntese e degradação de colágeno são os principais determinantes da fibrose tecidual após o IM (Sun et al., 2000). Nesse sentido, na fase aguda após o IM, o colágeno intersticial é intensamente degradado, contribuindo para o deslizamento do miócito e o adelgaçamento da parede do VE, processos essenciais na expansão do IM e dilatação do VE (Whittaker et al., 1991). No entanto, vários fatores são responsáveis pela fina regulação entre a produção e a degradação de colágeno, dentre eles, as MMP, TIMP, fator de transformação do crescimento beta (da singla em inglês, TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento de tecido conectivo (Creemers et al., 2001; Mill et al., 2011). Após a degradação do colágeno pelas MMP, dá-se início a ativação dos fibroblastos, os quais levam a sua

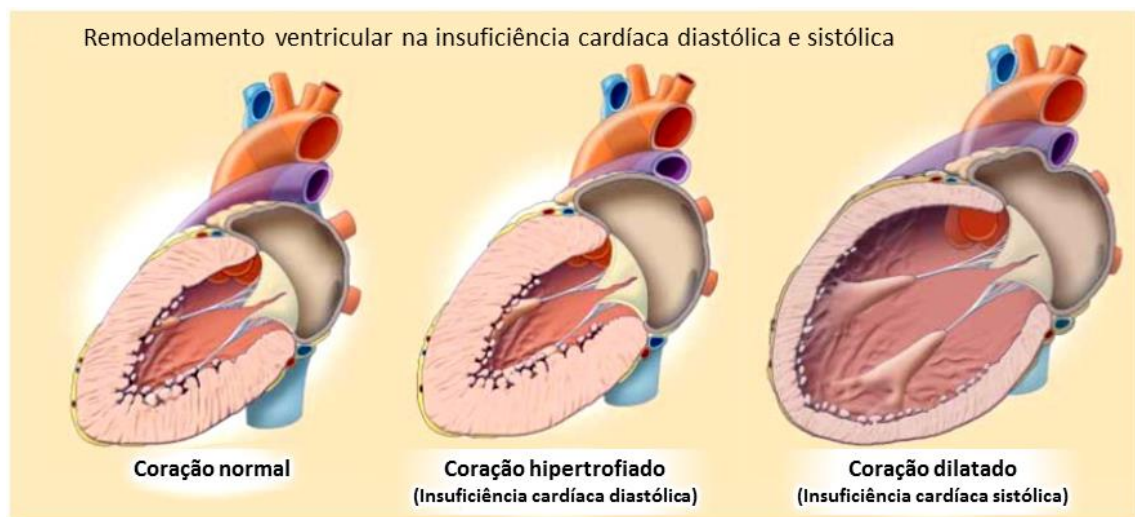
proliferação, diferenciação em miofibroblastos e subsequente síntese de MEC para o reparo tecidual (Kurose e Mangmool, 2016). Os miofibroblastos, por sua vez, são as células que produzem colágeno, proteínas contráteis e de mobilidade celular após a lesão cardíaca, sendo formados por várias moléculas a partir da diferenciação de fibroblastos residentes, perícitos, células endoteliais e células epiteliais, estimulados principalmente pelo TGF-  $\beta$ , assim como, pela Ang-II (Meng et al., 2016; Kurose e Mangmool, 2016; Chistiakov et al., 2016). Além disso, a resposta da MEC ao aumento do estresse mecânico sobre a parede ventricular também estimula a síntese de colágeno, o que torna a parede ventricular mais rígida, e, portanto, aumentando a pressão diastólica do VE (Hori e Nishida, 2009).

A hipertrofia ventricular é uma resposta adaptativa durante o remodelamento pós-IM, que ajuda a equilibrar o aumento da sobrecarga, atenuando a dilatação progressiva e estabilizando a disfunção contrátil do VE (Pfeffer e Braunwald, 1990). Esse processo é caracterizado primariamente, pelo aumento no tamanho da célula, aumento dos sarcômeros e reorganização dos componentes celulares, os quais dependem de uma regulação intracelular de síntese proteica (Mill et al., 2011).

Pequenos estiramentos mecânicos do VE demonstram uma estreita relação bidirecional entre o estresse de parede e a hipertrofia do miócito (Sadoshima et al., 1992). De forma crônica, a continuidade do estresse hemodinâmico leva a uma hipertrofia patológica e dilatação progressiva do VE, conforme visualizado na figura 3 (Orenstein et al., 1995). A hipertrofia contínua, que não é suficiente para conseguir normalizar o aumento da tensão de parede, inicia um programa de expressão gênica fetal, exemplificado pela mudança da predominância da isoforma alfa da miosina de cadeia pesada para a isoforma beta, a qual tem uma atividade ATPase mais lenta, acompanhada por um aumento na expressão do fator atrial natriurético, da forma

esquelética da alfa actina e uma subsequente redução do retículo sarcoplasmático cálcio ATPase (Orenstein et al., 1995), levando a uma consequente redução da função cardíaca.

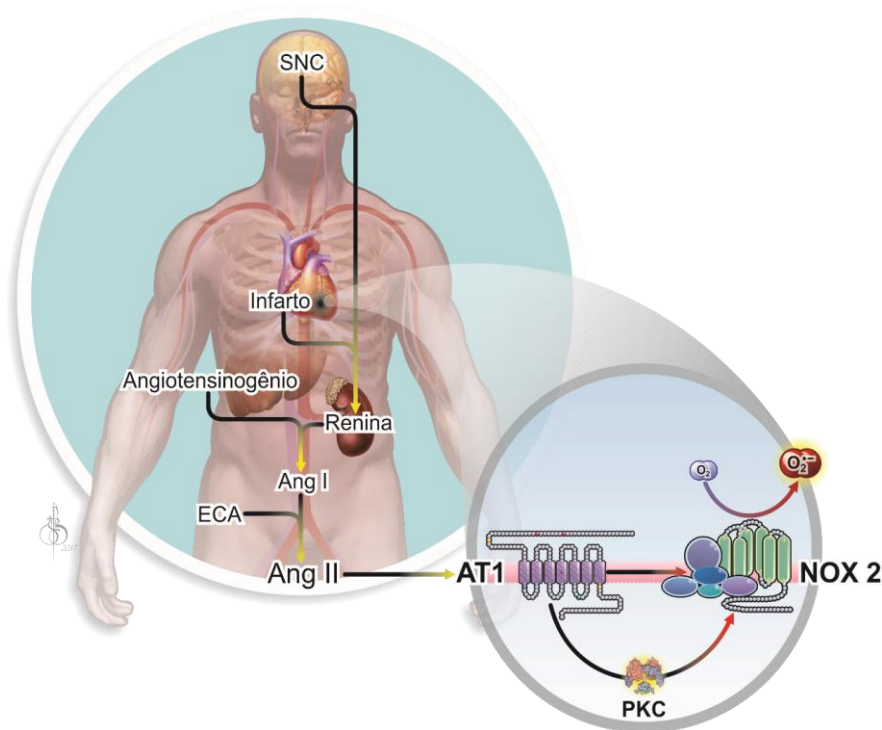
A hipertrofia cardíaca pode ser também estimulada por outros fatores, como pela ação neuro-hormonal, por fatores autócrinos e parácrinos e pela ativação local do SRA. Sadoshima et al., 1992, demonstraram *in vitro*, que o estiramento mecânico dos cardiomiócitos causa a liberação de Ang-II dentro de 10 minutos a partir do início do estímulo, além do aumento da expressão gênica do angiotensinogênio após 6 horas. Por outro lado, Zou et al., 2004, também *in vitro*, verificaram que o estresse mecânico é capaz de ativar o AT-1R de maneira independente, sem o envolvimento da Ang-II, induzindo a associação do AT-1R com a proteína JAK (do inglês, “Janus-activated protein kinase”), translocando a proteína G para o citosol e aumentando a produção de fosfoinosítídeo.



**Figura 3:** Hipertrofia e dilatação ventricular e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca sistólica e diastólica após o infarto do miocárdio. Adaptado de Jessup e Brozena, 2003.

Adicionalmente, o aumento da liberação de noradrenalina dos terminais sinápticos e a consequente ativação dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos no aparelho

justaglomerular, além da hipotensão observada após o IM, induzem a liberação de renina, aumentando os níveis de Ang-II circulantes (Sutton e Sharpe, 2000), conforme pode ser visualizado na figura 4. Dessa forma, podemos observar que a estimulação do AT-1R de maneira dependente ou independente da Ang-II exerce um papel fundamental sobre o processo de remodelamento, mediante a sinalização dos processos de hipertrofia e da fibrose intesticial após o IM. Corroborando esse raciocínio, foi demonstrado que o bloqueio do SRA com inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA-1) com ramipril (Wei et al., 2016), bloqueador do receptor AT-1R com losartan (Ju et al., 2007) e a inibição do receptor de Ang-II e da neprilisina, com LCZ696 (Valsartan/Sacubitril) (von Lueder et al., 2015), foram capazes de atenuar o remodelamento cardíaco adverso pela redução da hipertrofia e da deposição de colágeno, assim como, prevenir a disfunção cardíaca pós-IM.



**Figura 4:** Mecanismos responsáveis pela liberação de Angiotensina-II e ativação do receptor AT-1R após o infarto do miocárdio. Legenda: SNC, Sistema Nervoso Central; Ang I, Angiotensina I; ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; Ang II, Angiotensina II; AT 1, Receptor do tipo I da Angiotensina II; PKC, Proteína Quinase C; NOX 2, NADPH oxidase 2.

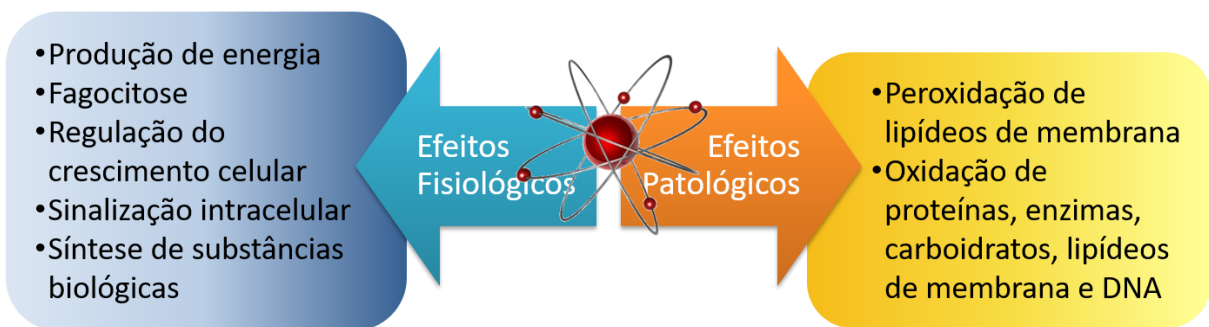


Além desses importantes fatores, usualmente, as EROS são geradas no miocárdio isquêmico, principalmente após a reperfusão (Hori e Nishida, 2009). As EROS são moléculas que se formam naturalmente no nosso organismo, provenientes do metabolismo oxidativo e que são reconhecidas como importantes sinalizadores intracelulares, quando em baixas concentrações, responsáveis por regularem uma grande variedade de vias de sinalização, mediante reações de oxidação e redução. Essas espécies compreendem 2 grupos principais de acordo com o seu grau de reatividade (Figura 5). O primeiro grupo é composto pelos radicais livres, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$  - espécie precursora), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), radicais lipídicos ( $ROO^{\cdot}$ ) e o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), que são espécies altamente instáveis e reativas (Halliwell, 2006). O  $O_2^{\cdot-}$ , pode ser gerado por diversas vias mediante a redução do oxigênio molecular, como a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, as enzimas xantina oxidase, óxido nítrico sintase desacoplada, ciclooxigenase e lipoxigenase, citocromo p450, NAD(P)H oxidase, mieloperoxidase e hemoproteínas (Cai e Harrison, 2000; Elahi, 2009; Frey et al, 2009). O outro grupo de EROS é composto por espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCL$ ), as quais são mais estáveis, possuindo um tempo de meia-vida maior que as espécies radicalares (Elahi et al, 2009; Paravicini e Touyz, 2008).

O desequilíbrio entre os sistemas geradores de EROS (pró-oxidantes) e o sistema antioxidante, de modo que haja predomínio das vias geradoras, leva a uma condição conhecida com estresse oxidativo (EO) (Halliwell, 2006). Essa condição pode gerar citotoxicidade pela formação excessiva de EROS resultando em uma série de alterações danosas à célula, reagindo rapidamente com biomoléculas, como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos de membrana, podendo causar danos

moleculares, como mutações no DNA e peroxidação de proteínas e lipídeos (Lambeth, 2004).

Espécies Reativas de Oxigênio		Espécies Reativas de Nitrogênio
Radicalares	Não radicalares	Óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) Óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) Ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) Peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ )
Hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) Superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) Peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) Alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ )	Oxigênio ( $\text{O}_2$ ) Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ )	

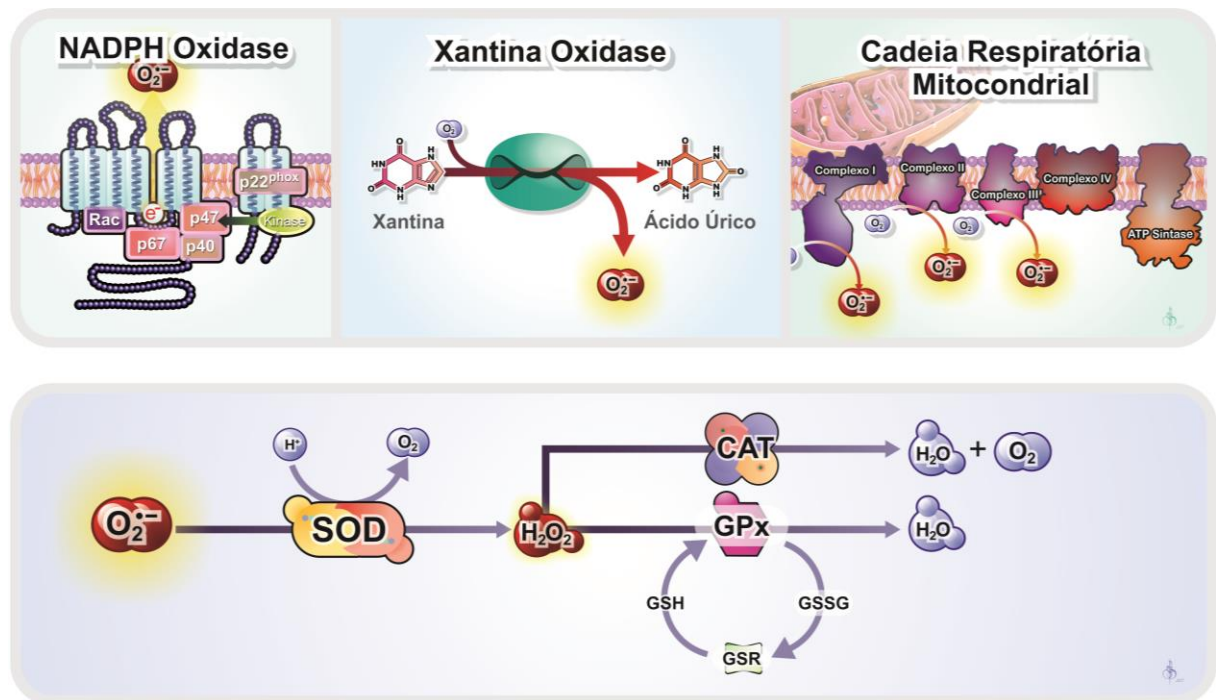


**Figura 5:** Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio produzidos pelo organismo, associados aos seus efeitos fisiológicos, quando em baixas concentrações, e aos seus efeitos patológicos em um estado de estresse oxidativo.

O EO é contrabalanceado pelo sistema antioxidante, a qual inclui enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Figura 6) (Paravicini e Touyz, 2008), assim como, moléculas produzidas endógenamente, como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, além de outras que são ingeridas através da dieta ou pela suplementação, como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (precursor da vitamina A) e grupos fenólicos de plantas (flavonóides) (Schneider e Oliveira, 2004).

Já tem sido amplamente reconhecido que o EO exerce um papel crítico na patogênese do reparo e do remodelamento cardíaco adverso pós-IM através de vários mecanismos, incluindo efeitos deletérios sobre componentes celulares,

prejuízos no metabolismo energético, alterações em diversas vias de sinalização e na viabilidade do miocárdio (Sirker et al., 2016; Sun et al., 2009). As principais fontes de EROS no miocárdio isquêmico são a mitocôndria e as enzimas xantina oxidase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase – NOX) (Hori e Nishida, 2009), como demonstrado na figura 6.



**Figura 6:** Principais vias de formação das espécies reativas de oxigênio (EROS) no miocárdio isquêmico, e as principais enzimas do sistema antioxidante. Legenda:  $O_2$ , Oxigênio Molecular;  $O_2^{\cdot-}$ , Ânion Superóxido;  $H_2O$ , Água;  $H_2O_2$ , Peróxido de Hidrogênio; SOD, Superóxido Dismutase; CAT, Catalase; GPx, Glutathione Peroxidase; GSR, Glutathione Redutase; GSH, Glutathione Reduzida; GSSG, Glutathione Oxidada.

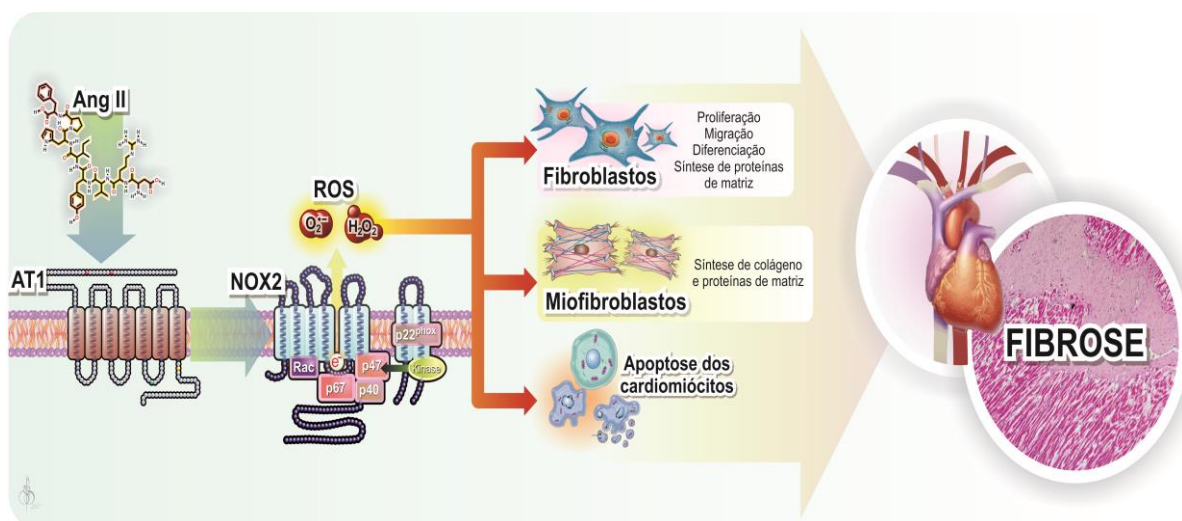
Dentre esses, a isoforma da NOX-2 (também conhecida como gp91phox), se constitui como uma das fontes mais importantes (Zhao et al., 2009; Sirker et al., 2016). A ativação dessa enzima requer uma heterodimerização entre suas diversas subunidades de membrana (gp91phox e p22phox) e citosólicas (p47phox, p67phox, p40phox e Rac1, uma pequena proteína GTPase) para sua completa atividade (Lambeth, 2004; Sirker et al., 2016). Portanto, essa enzima forma um complexo

associado a membrana que catalisa a redução de um elétron do oxigênio usando as coenzimas NADH ou NADPH como doadores de elétrons (Griendling et al., 2000).

Já foi previamente observado que essa enzima tem um importante papel na indução da hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial induzido por Ang-II (Figura 7). Esses efeitos têm sido consistentemente demonstrados em camundongos com deleção gênica para essa enzima (NOX-2<sup>-/-</sup>), sendo que tanto a hipertrofia quanto a fibrose foram inibidos nesse modelo quando submetidos a um curto período de infusão com Ang-II (Bendall et al., 2002). Além disso, nesse mesmo modelo animal (NOX-2<sup>-/-</sup>) (Looi et al., 2008), bem como, em camundongos com deleção da subunidade citosólica p47phox (p47phox<sup>-/-</sup>) dessa enzima, submetidos ao IM (Doerries et al., 2007), foi observado uma grande redução da fibrose intersticial, da hipertrofia do cardiomiócito e da apoptose, em conjunto com a redução da dilatação e da disfunção do VE. Adicionalmente, a expressão dessa enzima e da subunidade p22phox, encontram-se significativamente aumentada no miocárdio de animais infartados (Zhao et al., 2009; Almeida et al., 2014; Fukui et al., 2001). Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo mediado por esse complexo enzimático tem um papel fundamental na indução da disfunção cardíaca e do remodelamento adverso pós-IM.

Em contrapartida à toda essa cascata de eventos que tanto predispõe ao risco para DCV, a prática regular de exercícios físicos tem sido amplamente associada a vários benefícios para a saúde, sendo assim, um grande aliado terapêutico em diversas doenças do aparelho cardiovascular, bem como de outros sistemas. Nesse sentido, a mortalidade por todas as causas são atrasadas pela mudança de um estilo de vida sedentário, ou insuficientemente ativos, para aquele que atinge os níveis mínimos de recomendação, reduzindo o risco de desenvolvimento de doença arterial

coronariana, acidente vascular encefálico, diabetes do tipo 2, além de algumas formas de câncer, como o de cólon e o de mama (Graber et al, 2011). Dessa forma, podemos afirmar que a aquisição de um estilo de vida saudável é considerada como um elemento chave nas estratégias de prevenção primária e secundária.



**Figura 7:** Mecanismo de indução da fibrose intersticial no tecido cardíaco após o infarto do miocárdio, estimulado pela Angiotensina-II pela ativação do AT-1R e pelo aumento do estresse oxidativo mediado pelo complexo da NADPH oxidase. Legenda: Ang II, Angotensina II; AT 1, Receptor do tipo I da Angiotensina II; ROS, Espécies Reativas de Oxigênio; NOX 2, NADPH oxidase 2.

Em mulheres no período pós-menopausa, momento em que se observa um aumento do risco cardiovascular em decorrência da perda da cardioproteção conferida pelos estrógenos, vários são os relatos descrevendo os diversos efeitos benéficos associados a prática regular de exercícios. Estudos experimentais em modelo de deficiência estrogênica, demonstraram que o treinamento físico de natação melhora a vasoconstrição induzida pela Ang-II (Endlich et al., 2013) e a vasodilatação dependente do endotélio (Claudio et al., 2013) no leito coronariano, além de prevenir o aumento na deposição de gordura corporal (Claudio et al., 2013; Endlich et al., 2013). Além disso, em modelo de hipertensão pós-menopausa, Endlich et al., 2017,

verificaram uma significativa redução da pressão arterial, associado com uma melhora na reatividade vascular a Ang-II e a Ang-1-7 em anéis de aorta.

O tratamento de pacientes infartados, atualmente, utilizam o exercício físico como um dos elementos na reabilitação cardíaca (Wisløff et al., 2002). Nessa perspectiva, os programas de reabilitação cardíaca são reconhecidos como parte integral do acompanhamento de pacientes com doença arterial coronariana e tem recebido recomendação classe I de associações e sociedades internacionais de cardiologia, como a American Heart Association, American College of Cardiology e Sociedade Européia de Cardiologia, tendo o exercício físico consistentemente identificado como um componente central (Anderson et al., 2016).

No entanto, apesar de ser amplamente recomendado, os resultados atuais referentes aos efeitos globais do exercício físico a partir de estudos clínicos e experimentais sobre a função cardíaca e o remodelamento ventricular após o IM em condição de deficiência estrogênica, momento em que se observa a perda da cardioproteção conferida pelos estrógenos, ainda são escassos na literatura, havendo a necessidade de um maior entendimento das adaptações induzidas pelo exercício físico nessa condição. Nesse sentido, os diferentes tempos de início do treinamento físico após o IM é um importante parâmetro a ser avaliado, de maneira que determina, principalmente, a fase do processo de expansão do IM e do remodelamento em que o paciente/animal se encontram, influenciando diretamente a função ventricular esquerda.

Dentro dessa perspectiva, podemos destacar o trabalho de Jugdutt et al., 1988, que analisaram os efeitos de 12 semanas de treinamento físico iniciados 15 semanas após o IM sobre parâmetros ecocardiográficos e topográficos em pacientes pós-IM. Os autores observaram uma deterioração funcional e topográfica do VE com o

treinamento, caracterizados pelo aumento da distorção do formato, da expansão e adelgaçamento do VE.

Em contrapartida, outros estudos realizados em indivíduos infartados, a prática do exercício foi relacionada a melhora da capacidade aeróbia (Fontes-Carvalho et al., 2015), a reversão do remodelamento em pacientes com fração de ejeção preservada (McGregor et al., 2015), ambos com um protocolo de treinamento de força e endurance, assim como, a melhora da qualidade de vida e da capacidade funcional com o treinamento de endurance (Peixoto et al., 2015). Estudos em modelos animais, demonstram também que o exercício pode aumentar a contratilidade e reduzir a hipertrofia do miócito com treinamento em esteira (Wisløff et al., 2002) e melhorar o perfil inflamatório com um protocolo de treinamento resistido (Nunes et al., 2013). Em modelo de ratas com deficiência estrogênica, submetidas ao infarto do miocárdio, o exercício físico crônico iniciado quinze dias após o IM em esteira, reduziu a disfunção cardíaca e o remodelamento patológico (Almeida et al., 2014), e foi responsável pela melhora do controle reflexo da circulação (Flores et al., 2010).

No entanto, embora existam alguns trabalhos demonstrando os efeitos benéficos do exercício físico iniciado tanto em uma fase mais tardia (Wisløff et al., 2002; Almeida et al., 2014), quanto em uma fase mais precoce (de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010), após o infarto do miocárdio, ainda não se tem conhecimento sobre os efeitos do treinamento físico iniciado precocemente após o IM em ratas com deficiência estrogênica.

Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é que o exercício físico iniciado em uma fase mais precoce do processo de remodelamento após a indução do IM em ratas ovariectomizadas (3 dias pós-IM), possa estar associado com uma melhora

dos parâmetros funcionais, principalmente com relação a função diastólica, assim como, uma melhora do processo de remodelamento ventricular.

Desta forma, a deficiência dos hormônios ovarianos, característica do período pós-menopausal, eleva demasiadamente o risco para o desenvolvimento de DCV, uma vez que se tem reduzida a cardioproteção induzida pelo estrogênio. Além disso, mulheres que são acometidas pelo IM no período pós-menopausa, geralmente exibem um prognóstico pior quando comparadas aos homens (Piro et al., 2010), assim como, tem um risco aumentado para complicações pós-IM e para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Dunlay e Roger, 2012). Portanto, estudos dessa natureza contribuem para o melhor entendimento das adaptações promovidas pelo treinamento físico sobre o sistema cardiovascular de mulheres com deficiência estrogênica acometidas pelo IM, podendo assim, utilizar o exercício como um grande aliado terapêutico no sentido de reduzir a morbidade e mortalidade, assim como, promover melhoria na qualidade de vida dessa população.



## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos diferentes tempos de início de treinamento físico após a indução do infarto do miocárdio sobre a função cardíaca e o remodelamento ventricular esquerdo em ratas ovariectomizadas.

### **2.2- Objetivos Específicos**

Avaliar os efeitos de diferentes tempos de início do treinamento físico após a indução do infarto do miocárdio em ratas ovariectomizadas sobre:

- A função ventricular esquerda, avaliados pela pressão ventricular sistólica e diastólica final, além das derivadas positiva e negativa do desenvolvimento de pressão do ventrículo esquerdo;
- A extensão do infarto do miocárdio;
- O processo de remodelamento do ventrículo esquerdo pós-infarto do miocárdio, mediante a avaliação da hipertrofia do miócito e da deposição de colágeno na matriz extracelular;
- O estresse oxidativo cardíaco, mediante avaliação da produção “*in situ*” de radical superóxido e a oxidação de proteínas promovido pelo infarto do miocárdio;

- A expressão do receptor AT-1 da angiotensina II nas células cardíacas;
- A expressão da enzima pró-oxidante gp91phox (Nox-2) no tecido cardíaco;
- A expressão das enzimas antioxidantes SOD-1, SOD-2 e catalase no tecido cardíaco;
- A atividade das enzimas antioxidantes cardíacas, superóxido dismutase e catalase.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Animais Experimentais**

Foram utilizadas 54 ratas Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), com 12 semanas de idade e com peso corporal entre 220 e 260 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CCS da UFES sob parecer número 059/2012.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (n=4), com livre acesso à água e ração (Purina Labina®), sob condições de temperatura (22-24°C), e umidade (40-60%) controladas. O ciclo de luz foi regulado para períodos de 12/12 horas alternando entre claro e escuro.

#### **3.2- Ovariectomia**

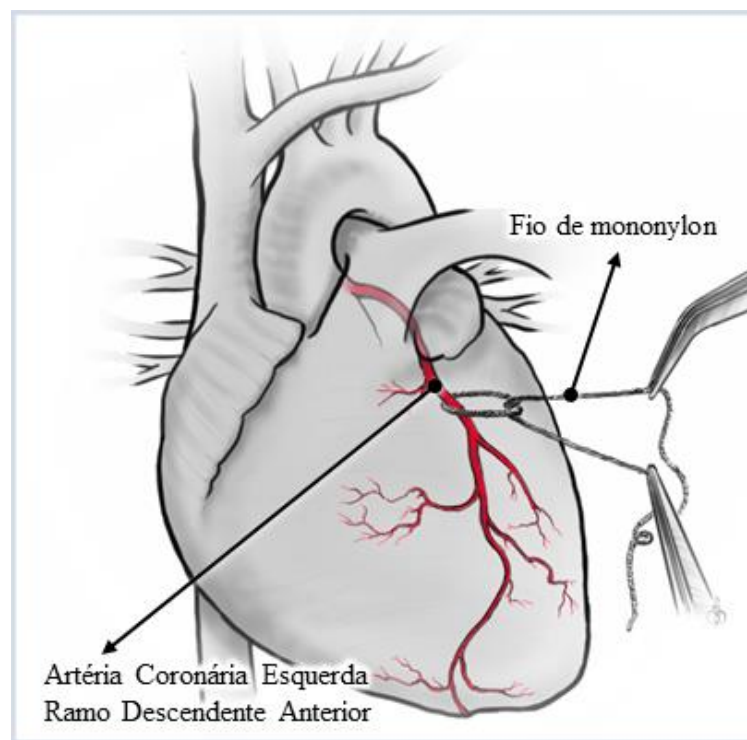
Após anestesia com ketamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) *i.p.*, as ratas foram submetidas a uma incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, tendo a cavidade peritoneal aberta para remoção dos ovários e ligadura da tuba uterina em ambos os lados. Após o procedimento foi feita a sutura da musculatura e da pele. Ao final do procedimento, os animais receberam uma injeção de antibiótico (enrofloxacino – 10 mg/kg, *i.m.*). Foi permitida a recuperação

pós-cirúrgica pelo tempo de 7 dias. Para comprovação do sucesso da cirurgia, após o sacrifício, o útero foi retirado e pesado úmido.

### **3.3- Indução do Infarto do Miocárdio**

O infarto do miocárdio foi obtido pela oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda (Figura 8), conforme a técnica descrita por Pfeffer et al. (1979). Sete dias após a ovariectomia, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Alcançado o plano anestésico desejável (confirmado pela ausência do reflexo da córnea), uma incisão lateral no nível do quarto espaço intercostal foi realizada para exposição do coração. A artéria foi localizada e permanentemente ocluída, usando um fio de mononylon 6.0 montado em agulha não traumática (Medical Line, Brasil). Após a oclusão, o tórax foi imediatamente fechado com uma sutura em bolsa previamente preparada. Após a sutura, os animais foram monitorados continuamente por eletrocardiograma (ECG), pelo tempo de 30 minutos, onde em posição supina em uma prancha, foram colocados 3 eletrodos padrão na pele dos animais, com 2 eletrodos na altura do coração sobre os membros anteriores direito e esquerdo, e o terceiro eletrodo (neutro) sobre o membro posterior, na linha do coração, conectados a um sistema de aquisição de dados (AdInstruments, Australia). Somente os animais que demonstraram sinais claros de lesão em decorrência da oclusão (monitorado pela elevação do segmento ST no ECG), foram incluídos no estudo como animais infartados. Os animais do grupo SHAM foram submetidos ao procedimento de cirurgia fictícia, que consistiu na aplicação de todos os passos descritos anteriormente, exceto pela oclusão da artéria coronária descendente anterior

esquerda. Após o procedimento cirúrgico os animais receberam uma injeção de antibiótico (enrofloxacino - 10 mg/kg, *i.m.*) e o manejo da dor pós-IM foi realizada durante 2 dias mediante a injeção de analgésico (dipirona monossódica – 100 mg/kg, *s.c.*).



**Figura 8:** Ilustração da indução do infarto do miocárdio, demonstrando a localização proximal do ponto de oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda.

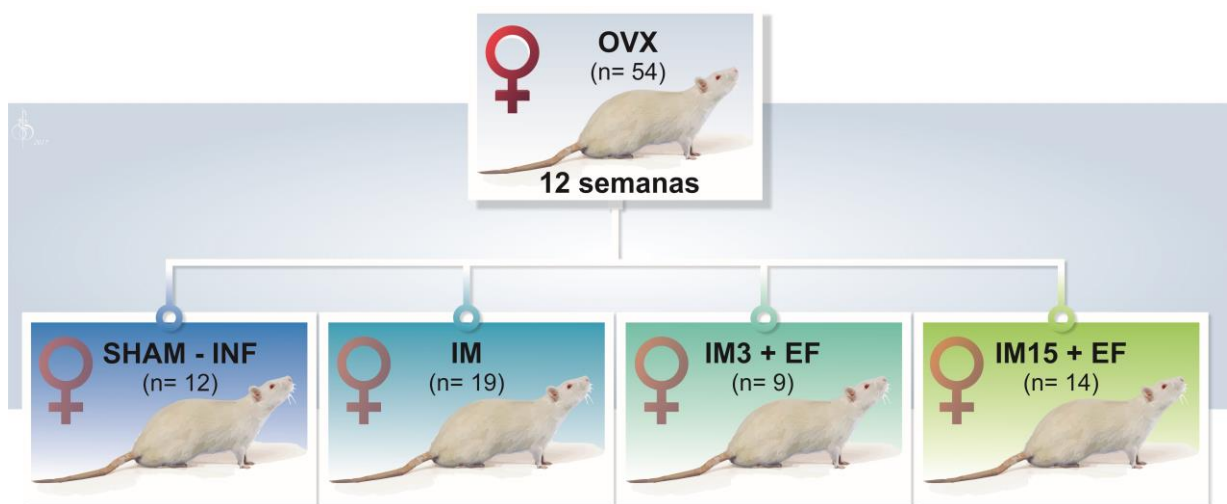
### 3.4- Grupos Experimentais

Após o procedimento cirúrgico de infarto do miocárdio os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos distintos (Figura 9):

- 1- Ratas OVX submetidas a cirurgia fictícia para a indução do IM (SHAM);
- 2- Ratas OVX submetidas ao IM que permaneceram sedentárias (IM);

- 3- Ratas OVX submetidas ao IM e que iniciaram o treinamento físico três dias após o IM (IM3+EF);
- 4- Ratas OVX submetidas ao IM e que iniciaram o treinamento físico quinze dias após o IM (IM15+EF).

A escolha dos dias para o início do treinamento (3 e 15 dias), foi baseado na divisão arbitrária das fases do remodelamento ventricular pós-IM, sendo que um grupo iniciou em uma fase mais precoce ( $\leq 72$  horas), e o outro em uma fase mais tardia, respectivamente (Sutton e Sharpe, 2000).

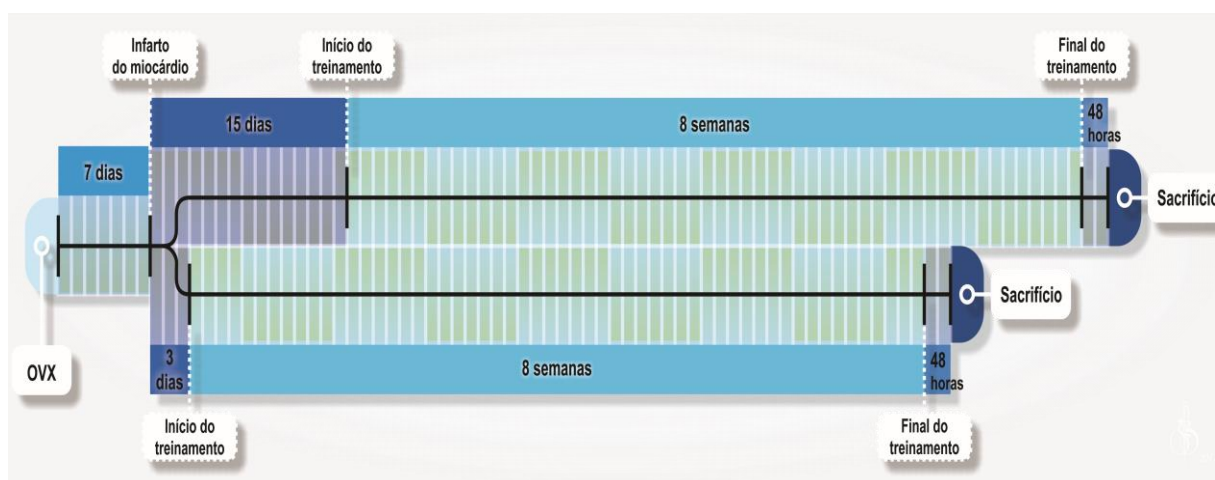


**Figura 9:** Divisão dos grupos experimentais. Legenda: OVX, Ovariectomia; IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico.

### 3.5- Protocolo de Treinamento Físico

O treinamento físico de corrida de intensidade baixa a moderada, foi realizado em uma esteira motorizada (EP 131, Insight, Brasil), sem o auxílio de estímulos nocivos (como choque de baixa voltagem, por exemplo) e dividido em duas etapas, conforme protocolo progressivo adaptado previamente para estudos em ratas infartadas e

ovariectomizadas (Flores et al., 2010; Almeida et al., 2014). A primeira etapa foi o período de adaptação (10 min/dia a 0.3 km/h), com duração de uma semana e aumento progressivo no tempo até o quinto dia (60 min/dia a 0.3 km/h). A partir da segunda semana, o treinamento teve duração de 60 min/dia, realizado cinco vezes por semana. Nessa segunda etapa de treinamento, a velocidade foi gradualmente aumentada de 0.3 para 1.2 km/h, durante oito semanas. Dessa forma, na segunda semana, a velocidade foi aumentada para 0.5 km/h, na terceira semana para 0.7 km/h, na quarta semana para 0.8 km/h, na quinta semana para 0.9 km/h, na sexta semana para 1 km/h, na sétima semana para 1.1 km/h e na oitava semana para 1.2 km/h. O protocolo de treinamento físico teve início três dias após o IM para o grupo IM3+EF, e quinze dias após o infarto do miocárdio para o grupo IM15+EF (Figura 10).

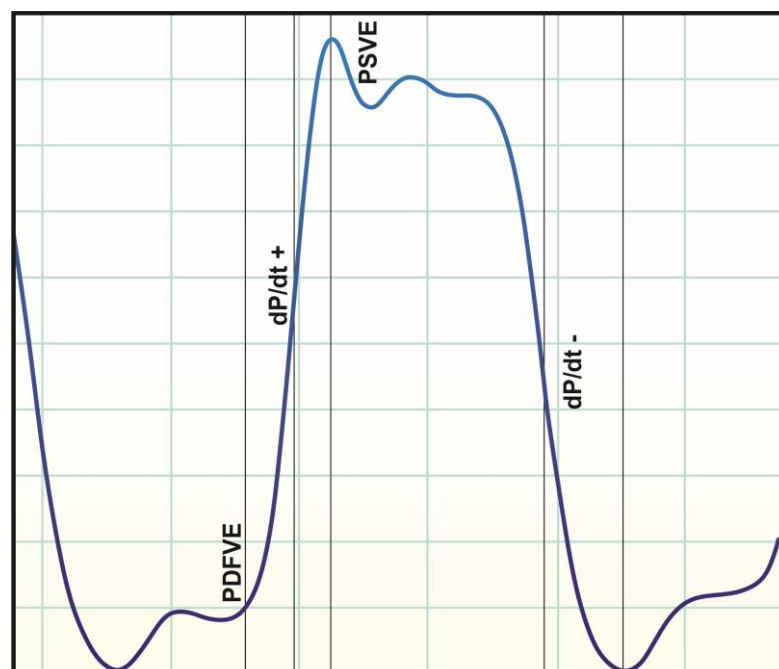


**Figura 10:** Desenho do protocolo experimental. Legenda: OVX, Ovariectomia.

### 3.6- Avaliação da Função Cardíaca

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento físico, os animais foram anestesiados com uma mistura contendo ketamina (70mg/kg, Agener, Brasil) e

xilazina (10mg/kg, Bayer, Brasil) por via intraperitoneal. Um cateter de polietileno (PE50) preenchido com solução salina heparinizada (50 U/mL) foi introduzido na artéria carótida direita e em seguida conectado a um transdutor de pressão (FE221 Bridge amp, ADInstruments, Austrália) o qual foi acoplado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/35, ADInstruments, Austrália). Primeiramente, foram obtidos os dados hemodinâmicos de frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM). Depois, o cateter foi vagarosamente introduzido no ventrículo esquerdo, onde foram obtidos os dados de pressões sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), além da derivada máxima de contração e relaxamento ( $+dP/dt$  e  $-dP/dt$ , respectivamente) (Figura 11). Após a avaliação dos parâmetros ventriculares, o cateter foi recuado para a artéria carótida novamente, a fim de se verificar a integridade da valva aórtica.



**Figura 11:** Curva de pressão ventricular demonstrando os pontos onde foram obtidas as variáveis. Legenda: PDFVE, Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo;  $dP/dt+$ , Derivada Positiva do Desenvolvimento de Pressão;  $dP/dt-$ , Derivada Negativa do Desenvolvimento de Pressão; PSVE; Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo.



### **3.7- Coleta dos Tecidos para Pesagem, Medição e Armazenamento**

Após a coleta dos dados funcionais, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi aberta para a remoção dos seguintes tecidos para pesagem: coração (separados posteriormente para pesagem do VE), pulmão (peso úmido e seco, para a determinação do percentual de água no pulmão), útero e os coxins de gordura retroperitoneal, parametrial e mesentérico, as quais foram utilizadas para o cálculo do peso total de gordura e para a determinação do índice de adiposidade, que foi calculado de acordo com a fórmula  $(\text{gordura corporal total} / \text{peso corporal final}) \times 100$  (Leopoldo et al., 2016). A pesagem foi realizada em uma balança analítica digital com precisão de 0,0001g (Shimadzu, São Paulo, Brasil), e, para a pesagem do tecido seco, o pulmão permaneceu durante 24 horas em estufa a uma temperatura de 98° C. O músculo sóleo foi removido do membro posterior direito do animal e armazenado em freezer a -80° Celsius (C) para a posterior análise da atividade da enzima citrato sintase, além da tíbia, do mesmo membro, utilizada para a medição do seu comprimento com o auxílio de um paquímetro para a normalização dos dados ponderais. O VE de um grupo de animais, após a pesagem, foram armazenados em freezer a -80° C para as análises moleculares, e de outro grupo de animais foram estocados em formol tamponado a 10% para a execução das análises histológicas.

### **3.8- Estudo da Expressão Proteica**

#### **3.8.1 Western Blotting para Detecção da Expressão Proteica**

A técnica de Western Blotting foi utilizada para determinar a influência do treinamento físico de esteira sobre a expressão de proteínas do sistema renina-angiotensina, do sistema pró-oxidante e do sistema antioxidante. A expressão de todas as proteínas foram realizadas em condições basais, ou seja, os tecidos cardíacos foram coletados cerca de 48 horas após o último dia de treinamento, e conservados até o dia do experimento no freezer à -80° C.

### **3.8.2- Extração, Quantificação de Proteínas e Preparo das Amostras**

A homogeneização dos tecidos cardíacos congelados foram realizados em tubos plásticos contendo tampão de lise (1% de Nonidet P40, 0,5% de Deoxicolato de Sódio, 0,1% de SDS, pH igual a 7,2). Por conseguinte, foi adicionado uma pílula contendo inibidores de proteases e EDTA (Sigma Fast, Sigma, EUA) para cada 10 mL de tampão de lise, Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 1M e NaF 5M na proporção 1mL/100mg. As amostras foram centrifugadas por 40 segundos a uma velocidade de 6500 rpm, e em seguida centrifugados novamente durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C (Eppendorff, Alemanha). O *pellet* formado foi descartado e a concentração protéica do sobrenadante foi então quantificado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando-se espectrofotômetro com absorbância de 750nm. Comparou-se a concentração proteica das amostras com uma curva de albumina sérica bovina (BSA), em concentrações conhecidas, utilizada como padrão. A leitura da curva e de todas as amostras foi feita em triplicata.

Preparou-se alíquotas contendo o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, além do tampão de amostra (Lammeli 5X) (4 mL de Tris-HCl 1,5M pH 6,8, 10 mL de glicerol, 5 mL de β-mercaptoetanol, 2 g de SDS, 1mL de 1% azul de

bromofenol). Todas as alíquotas foram padronizadas para um volume final de 15 µL completando o volume de cada uma com água Milli-Q, quando necessário. As amostras depois de preparadas foram aquecidas a 95° C durante 5 minutos.

### **3.8.3- Eletroforese e Transferência das Amostras**

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida a 10% (gel de corrida: 0,5 M Tris HCl pH:6,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) e 10% (gel de entrada: 1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed). Após a preparação dos géis, os mesmos foram imersos em um tampão de corrida para eletroforese (25 mM de Tris HCl ,190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e foi realizado o carregamento com as amostras nos respectivos géis. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 2 horas para a separação das proteínas pelo peso molecular (PowerPac™ HC, BioRad, CA, EUA). Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno - PVDF (Merck Millipore, EUA) em um sistema de transferência molhado. Para isso, o gel, a membrana e o papel filtro foram montados em um sistema de sanduíche banhados por uma solução de tampão de transferência que foi mantida em aproximadamente 4° C durante todo processo de transferência (Tris 25mM, glicina 190mM, e Metanol 20%), com corrente constante de 100 V por 1:30 horas.

### **3.8.4 Incubação com Anticorpos Primários e Secundários**

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,6), com o objetivo de evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas pelo período de 4 horas à 4°C, sob agitação, em TBS-T adicionado com os anticorpos primários policlonal anti-rabbit para o AT-1R (Diluição 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), policlonal anti-rabbit para gp91phox (Diluição 1:1000, BD Bioscience, New Jersey, EUA), policlonal anti-rabbit para a isoforma citosólica da enzima superóxido dismutase - SOD-1 (Diluição 1:1000), policlonal anti-rabbit para a isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase – SOD-2 (Diluição 1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), monoclonal anti-mouse para a enzima catalase (Diluição 1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e monoclonal anti-rabbit para a GAPDH (Diluição 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), proteína que foi utilizada como controle. Depois disso, as membranas foram lavadas três vezes, sob agitação, com solução TBS-T para remoção do excesso de anticorpo primário e possível ligação inespecífica. A solução de TBS-T foi trocada a cada 10 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação com os anticorpos secundários conjugadas a enzima fosfatase alcalina anti-mouse IgG (Diluição 1:3000, Abcam, Cambridge, MA, EUA), ou um anticorpo anti-rabbit IgG (Diluição 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).

### **3.8.5 Detecção das Proteínas**

A detecção das bandas das proteínas de interesse foi realizada por meio da adição de uma solução de nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate

(NBT/BCIP system – Invitrogen, CA, EUA). Para a quantificação da densidade das bandas foi utilizado o software ImageJ (National Institute of Health, NIH, EUA), e os resultados foram calculados utilizando a relação entre a densidade das proteínas de interesse corrigidas pela intensidade da proteína utilizada como controle (GAPDH).

### **3.9- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase**

A avaliação da atividade da SOD no tecido cardíaco foi feita de acordo com o protocolo descrito por Misra e Fridovich, 1972. Foram adicionados 0,1 mL do homogenato (0,25 mg/mL) a uma cubeta de quartzo contendo 1 mL do tampão carbonato (0,2 M, pH 10,2), 0,8 mL de KCl (0,015 M) e o volume completado com água para 3 mL. A reação foi iniciada com a adição de epinefrina (0,025 M), a leitura foi realizada em espectrofotômetro à 480nm por 1 min em intervalos de 15 segundos, de maneira simultânea foi realizado a leitura de controle contendo apenas epinefrina e a mistura reacional. A atividade da enzima foi representada por Unidades de SOD/mg de proteína. A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976).

### **3.10- Atividade Enzimática da Catalase**

O ensaio da atividade da catalase foi realizado conforme o método de Nelson e Kiesov (1972). Foram adicionados 2 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7.0), junto a alíquota do sobrenadante obtido após a homogeneização dos tecidos, e em seguida foi adicionado o substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3 M). A leitura foi realizada durante 1 minuto à 25°C em espectrofotômetro a 240nm. A atividade da catalase foi expressa em

$\Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, sendo que  $\Delta E$  corresponde a variação da atividade da enzima pelo período de um minuto.

### **3.11- Detecção “*in situ*” da Produção Cardíaca de Superóxido**

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada pelo método de fluorescência ao dihidroetídeo (DHE), um precursor não fluorescente, que quando é oxidado pelo radical superóxido, forma o produto fluorescente 2-hidróxietídeo (2- $E^+OH$ ), permitindo analisar a produção “*in situ*” de radical superóxido (Owusu-Ansah et al., 2008). Cortes transversais do ventrículo esquerdo congelado (8  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos e colocados em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com solução de Krebs por 30 minutos a 37°C, em seguida, com DHE 2  $\mu\text{M}$  (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz. A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500 TI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 100x. A intensidade da fluorescência gerada nas imagens foram quantificadas pelo programa Image ProPlus, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

### **3.12- Avaliação dos Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP)**

A quantificação da concentração de AOPP foi feita em espectrofotômetro em amostras de tecido cardíaco dos animais, conforme protocolo descrito por Valente et al. (2013). Para isso, as amostras foram diluídas em tampão PBS (1:5) diretamente na microplaca de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 20 µL de ácido acético glacial no poço, e realizada a leitura imediatamente em um leitor de microplacas (BioTek – Synergy™ HTX, USA) a um comprimento de onda de 340nm. Foi gerada uma curva padrão a partir de uma solução de cloramina-T na presença de iodeto de potássio. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas e expressas como µmol/L.

### **3.13- Análises Histológicas**

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular do Departamento de Morfologia da UFES. Após avaliação da função cardíaca, os ventrículos esquerdos foram fixados em formol tamponado a 10%. Fatias transversais de aproximadamente 2 mm foram realizadas nos ventrículos esquerdos para posteriores análises histológicas. Para a determinação da hipertrofia e fibrose, cada fatia (2 mm) foi cortada em seções transversais de 4 µm de espessura e coradas com picrosírius (Picrosírius Red, F3BA, Fluka, EUA) para determinar a área ocupada por colágeno e hematoxilina-eosina (Vetec, Brazil) para determinar área de secção transversa do miócito. A porcentagem de coloração vermelho do Picrosírius indicou o valor percentual ocupada por colágeno. Nove áreas de cada corte foram analisadas na camada subendocárdica e subepicárdica. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (Evolution, Media Cybernetics Inc., Bethesda, EUA) acoplado a um microscópio óptico (Eclipse 400, Nikon) sob

aumento de 400x. A área de secção transversa do miócito, 40 a 60 miócitos posicionado perpendicularmente ao plano da secção e tendo tanto um núcleo visível e uma membrana de células claramente definida e ininterrupta foram selecionados em cada animal. Imagens celulares vistos com uma câmera de vídeo foram projetados em um monitor e rastreado. Imagens para a quantificação da deposição de colágeno e avaliação da área de secção transversa do miócito foram processadas com o software ImageJ (v. 1.43u, NIH, EUA). Para a análise da extensão do infarto do miocárdio, o ventrículo esquerdo foi divididos em secções transversais e corados com Picrosírius. As secções de imagem foram digitalizadas (Laserjet Pro M1132, HP, EUA) e também analisados com o software ImageJ. O perímetro do epicárdio relacionada à área infartada foi delimitado por coloração com Picrosírius. Todos os procedimentos foram repetidos para o endocárdio. A extensão do infarto foi apresentada como o valor percentual médio do perímetro infartado do ventrículo esquerdo (Forechi et al. 2012).

### **3.14- Atividade da Enzima Citrato Sintase**

Para a análise da eficácia do treinamento físico, o músculo sóleo do membro posterior direito de cada animal foi removido e homogeneizado em um tampão de extração fosfato (fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM e cocktail contendo inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) com pH 7,4, centrifugadas durante 15 minutos a 12000 g e 4°C. A quantificação de proteína foi realizado pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Após a quantificação de proteína, foi testada a quantidade de proteína a ser usada no ensaio. Para isso, foi pipetado 7,5, 15, 30 ou 60 µg/µl de proteína em cada poço da



placa para cultura de célula, adicionado 200 µl de mistura de ensaio e 11 µl de substrato (oxaloacetato 0,5 mM). Para análise das amostras foi adicionado 15 µg/µl da amostra e em seguida a mistura de ensaio, com a placa posicionada para a leitura foi pipetado o substrato e realizado a leitura. O tempo de duração do ensaio foi de 5 minutos, realizando a leitura de cinco amostras por vez, com comprimento de onda de 412nm e temperatura da leitura a 25°C. A atividade máxima da citrato sintase foi medida dentro do intervalo linear do ensaio (Alp et al., 1976).

### 3.15- Análise Estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para a avaliação da normalidade da distribuição dos dados, foi utilizado o teste de D'Agostino e Pearson. A taxa de sobrevivência foi avaliada pelo teste exato de Fisher. As médias dos grupos referentes aos dados com distribuição normal, foram avaliados pela análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). Foi utilizado o teste *post-hoc* de Fisher para múltiplas comparações. Para a análise dos dados em que foi observado uma distribuição não normal, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn's para múltiplas comparações. Os valores de alfa menores do que 5% foram considerados como estatisticamente significativos. Para a execução dos testes estatísticos e construção das figuras, foi utilizado o software GraphPad Prisma 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

## **4- RESULTADOS**

### **4.1- Peso Corporal e Adiposidade**

O peso corporal inicial, como observado na tabela 1, não foi diferente entre os grupos experimentais. Ao final do período de treinamento de oito semanas, o peso corporal do grupo IM15+EF foi significativamente menor quando comparado aos grupos SHAM e IM ( $p < 0.05$ ). No entanto, foi observado um menor peso de gordura dos coxins retroperitoneal, parametrial e também da gordura total nos grupos submetidos ao treinamento (Tabela 1), comparados aos grupos SHAM e IM ( $p < 0.05$ ). Em relação ao peso da gordura mesentérica, foi observado uma redução somente no grupo IM15+EF comparado aos grupos SHAM e IM ( $p < 0.05$ ). Entretanto, quando o índice de adiposidade foi avaliado, observamos um percentual menor nos grupos treinados quando comparados ao grupo IM ( $p < 0.05$ ). Esses resultados demonstram os efeitos do treinamento físico sobre a prevenção do acúmulo excessivo de gordura causado pela deficiência estrogênica.

### **4.2- Taxa de Sobrevivência, Efetividade da Ovariectomia e do Treinamento Físico**

A taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao IM foram: grupo IM (58%), grupo IM3+EF (89%) e para o grupo IM15+EF (93%), sendo significativamente maior nos grupos submetidos ao treinamento físico quando comparados ao grupo sedentário ( $p = 0.025$ ). O peso uterino foi utilizado como parâmetro para a avaliação da efetividade da cirurgia de ovariectomia. Para tanto, não foram detectadas

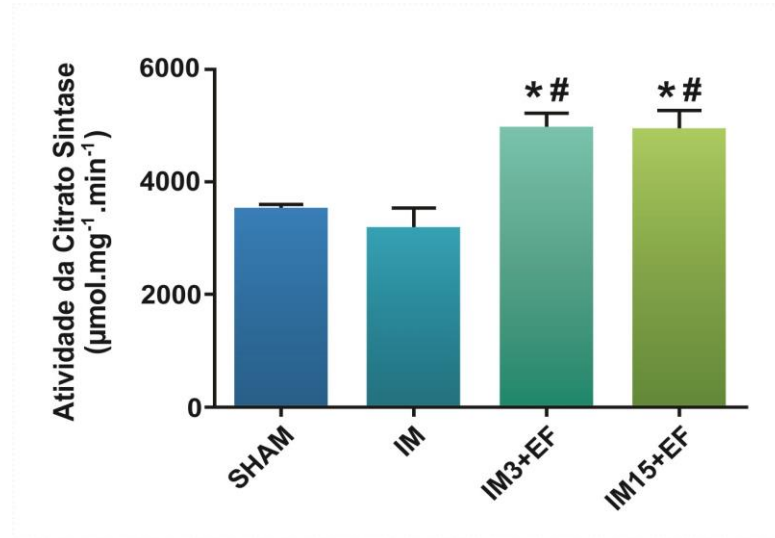
diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 1), indicando assim, a efetividade da cirurgia.

A atividade da enzima citrato sintase foi utilizado como um indicador para a avaliação da capacidade oxidativa muscular dos animais, com o objetivo de analisar a efetividade do protocolo de treinamento físico do presente estudo. Contudo, como esperado, a atividade da enzima foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) nos dois grupos submetidos ao treinamento físico (Figura 12), indicando assim, a adaptação promovida pelo treinamento físico regular durante oito semanas.

**Tabela 1:** Parâmetros ponderais corporal, uterino, de adiposidade e cardíaco das ratas ovariectomizadas.

	SHAM	IM	IM3+EF	IM15+EF
<b>PC inicial (g)</b>	245 ± 11	239 ± 11	233 ± 5	247 ± 6
<b>PC final (g)</b>	325 ± 11	329 ± 10	307 ± 15	270 ± 22 <sup>#</sup>
<b>Peso uterino (g)</b>	0.11 ± 0.007	0.09 ± 0.003	0.10 ± 0.008	0.09 ± 0.003
<b>PGord retroperitoneal (g)</b>	5.66 ± 0.82	5.64 ± 0.59	3.35 ± 0.54 <sup>#</sup>	3.75 ± 0.66 <sup>#</sup>
<b>PGord parametrial (g)</b>	9.29 ± 1.40	9.88 ± 1.25	5.23 ± 0.74 <sup>#</sup>	6 ± 1.06 <sup>#</sup>
<b>PGord mesentérica (g)</b>	7.01 ± .62	6.68 ± 0.64	5.84 ± 0.57	4.86 ± 0.67 <sup>#</sup>
<b>PGord total (g)</b>	21.60 ± 2.73	22.21 ± 2.32	14.43 ± 1.71 <sup>#</sup>	14.61 ± 2.27 <sup>#</sup>
<b>Índice de adiposidade (%)</b>	6.47 ± 0.77	6.74 ± 0.61	4.81 ± 0.55 <sup>#</sup>	4.79 ± 0.62 <sup>#</sup>
<b>PCor/Tíbia (mg/mm)</b>	21.31 ± 0.72	36.58 ± 1.37 <sup>*</sup>	31.11 ± 1.60 <sup>#</sup>	31.91 ± 3.02 <sup>*</sup>
<b>VE/Tíbia (mg/mm)</b>	14.82 ± 0.52	18.51 ± 1.38 <sup>*</sup>	19.25 ± 1.05 <sup>*</sup>	16.07 ± 0.94 <sup>§</sup>
<b>Peso do pulmão (g)</b>	1.70 ± 0.06	2.88 ± 0.35 <sup>*</sup>	3.39 ± 0.23 <sup>*</sup>	2.42 ± 0.25 <sup>§</sup>
<b>Água no pulmão (%)</b>	80.08 ± 0.46	81.91 ± 0.49 <sup>*</sup>	82.51 ± 0.28 <sup>*</sup>	81.92 ± 0.46 <sup>*</sup>

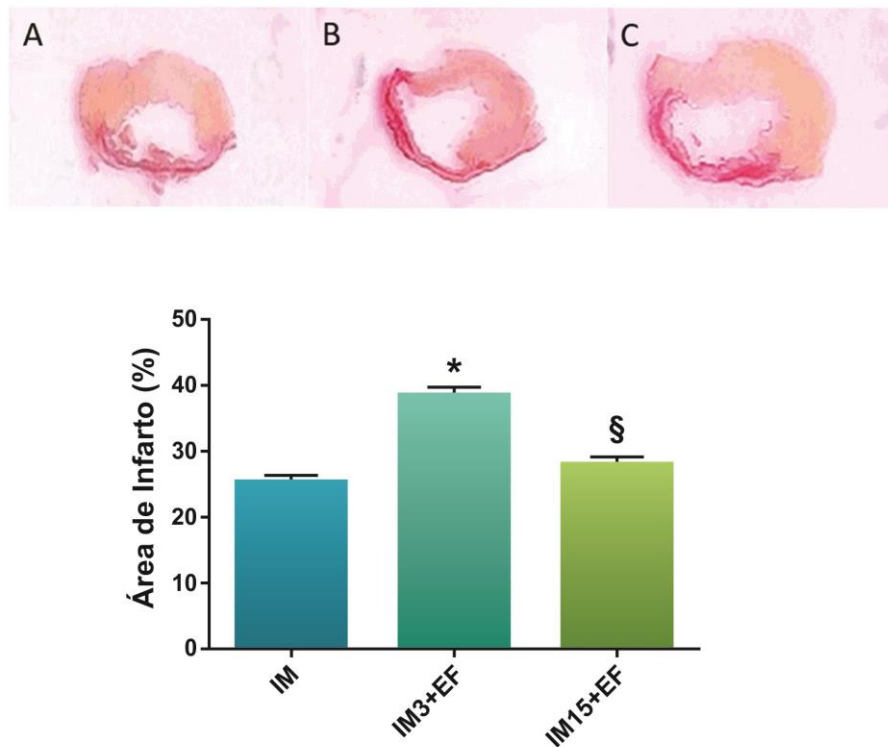
Os dados são expressos com média ± EPM. Análise de variância de uma via seguido pelo pós-teste de Fisher. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. SHAM; <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. IM; <sup>§</sup> $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; PC, Peso Corporal; PGord, Peso de Gordura; PCor, Peso do Coração; VD, Ventrículo Direito; VE, Ventrículo Esquerdo.



**Figura 12:** Avaliação da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo dos animais após 8 semanas de treinamento físico. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher.  $n=5$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico.

#### 4.3- Extensão do Infarto do Miocárdio

A análise da extensão do IM após a oclusão coronariana, avaliado a área ocupada pela cicatriz (Figura 13), demonstra que o grupo que iniciou o treinamento 3 dias após o infarto teve uma área de infarto significativamente maior quando comparado aos grupos IM e IM15+EF ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13:** Área de infarto cardíaca após o treinamento físico durante 8 semanas. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Imagens representativas dos grupos IM (A), IM3+EF (B) e IM15+EF (C). Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher.  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico.

#### 4.4- Hemodinâmica e Função Cardíaca

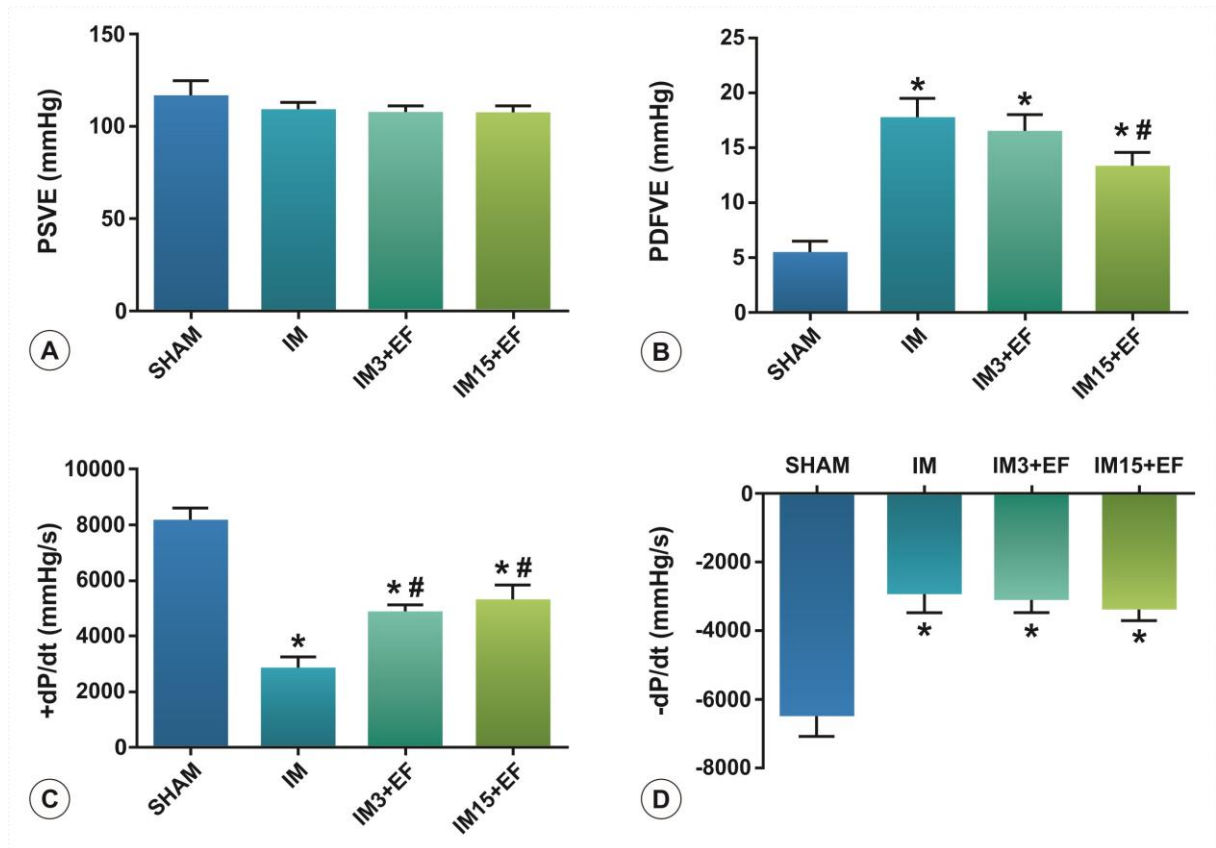
Os dados dos parâmetros hemodinâmicos estão demonstrados na tabela 2. Não foram detectadas diferenças entre os grupos sobre a frequência cardíaca. Houve uma redução significativa da PAD e da PAM no grupo IM, quando comparado ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ). Com relação a função do VE, não foram observadas diferenças entre os grupos com relação a pressão sistólica do VE (Figura 14-A). Por outro lado, quando analisamos a pressão diastólica final do VE (PDFVE - Figura 14-B), verificamos que houve um aumento significativo nos três grupos submetidos ao IM em relação ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ), em consonância com a redução das

derivadas positiva e negativa (+dP/dt e -dP/dt, respectivamente) de pressão do VE (Figuras 14-C e D, respectivamente), indicando assim, a progressão da insuficiência cardíaca nos grupos submetidos ao IM. No entanto, foi observado uma redução significativa na PDFVE somente no grupo IM15+EF quando comparado ao grupo IM ( $p < 0.05$ ). Em relação a +dP/dt, podemos verificar que ambos os grupos treinados conseguiram atenuar sua redução após o IM ( $p < 0.05$ ), quando comparadas ao grupo IM, o que não ocorreu com a -dP/dt.

**Tabela 2:** Parâmetros hemodinâmicos.

	<b>SHAM</b>	<b>IM</b>	<b>IM3+EF</b>	<b>IM15+EF</b>
<b>FC (bpm)</b>	194 ± 9	180 ± 15	183 ± 5	205 ± 9
<b>PAS (mmHg)</b>	135 ± 9	118 ± 4	127 ± 5	124 ± 4
<b>PAD (mmHg)</b>	105 ± 6	92 ± 2*	98 ± 2	97 ± 3
<b>PAM (mmHg)</b>	119 ± 7	103 ± 3*	110 ± 3	109 ± 3

Os dados são expressos como média ± EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. \* $p < 0.05$  vs. SHAM. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico, FC, Frequência Cardíaca; bpm, Batimentos por Minuto; PAS, Pressão Arterial Sistólica; PAD, Pressão Arterial Diastólica; PAM, Pressão Arterial Média; mmHg, Milímetros de Mercúrio.

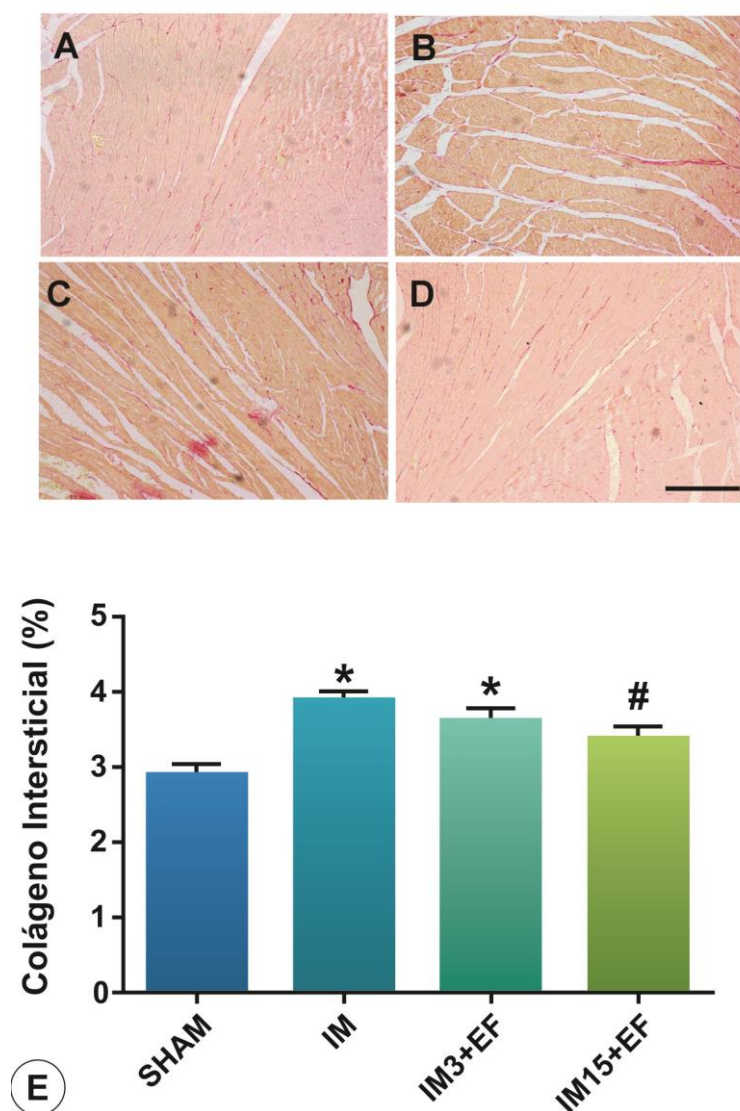


**Figura 14:** Avaliação dos parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo após 8 semanas de treinamento físico demonstrando em (A) Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo (PSVE), (B) Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo, (C) Derivada Positiva do Desenvolvimento de Pressão (+dP/dt) e (D) Derivada Negativa do Desenvolvimento de Pressão (-dP/dt). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações.  $n = 7-8$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; mmHg, Milímetros de Mercúrio; mmHg/s, Milímetros de Mercúrio por segundo.

#### 4.5- Avaliação do Colágeno Intersticial e Hipertrofia do Miócito Cardíaco

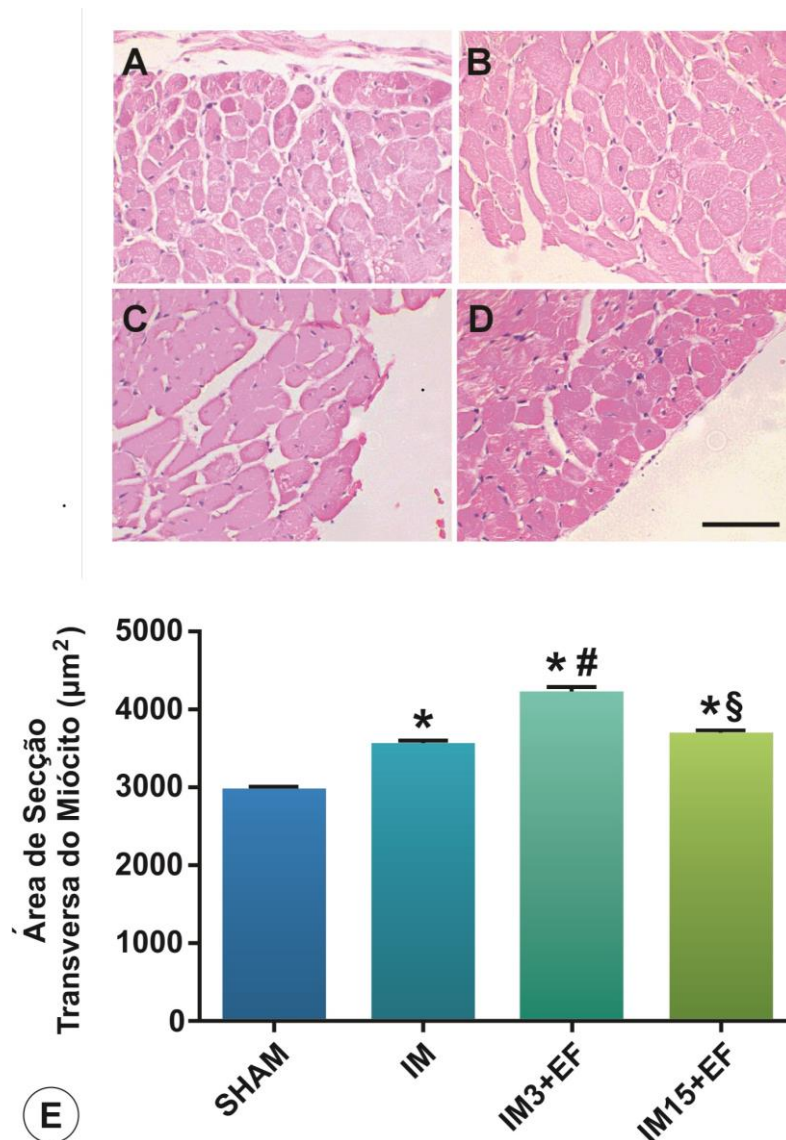
Conforme visualizado na figura 15, podemos observar que houve um aumento na deposição de colágeno intersticial induzido pelo IM nos grupos IM e IM3+EF quando comparados ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ). No entanto, somente o grupo IM15+EF conseguiu prevenir o desenvolvimento da fibrose cardíaca, uma vez que a deposição de colágeno intersticial foi significativamente menor quando comparado ao grupo IM ( $p < 0.05$ ).

Com relação a hipertrofia do miócito cardíaco, avaliado pela área de secção transversa (Figura 16), foi observado um aumento da área dos miócitos de todos os grupo submetidos ao IM ( $p < 0.05$  vs. SHAM). Porém, houve um aumento mais pronunciado no grupo que iniciou o treinamento 3 dias após o infarto, uma vez que a área do miócito nesse grupo foi significativamente maior do que os observados nos grupos IM e IM15+EF ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15:** Avaliação do colágeno intersticial após o final do período de treinamento físico. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Imagens representativas dos grupos Sham (A), IM (B), IM3+EF (C), IM15+EF (D). Avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações.  $n = 5-7$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM. Aumento: 400x. Barra: 200  $\mu$ m. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico.



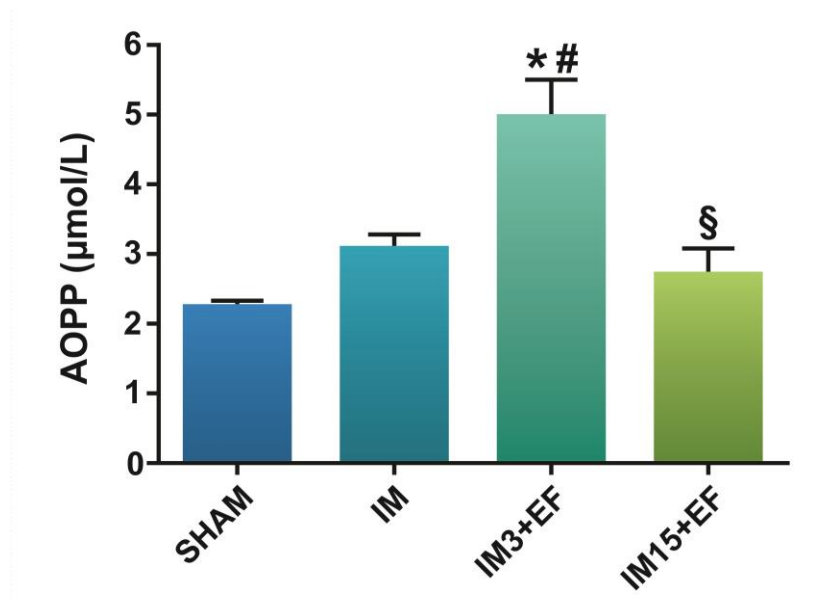


**Figura 16:** Avaliação da área de secção transversa dos miócitos cardíacos após o final do período de treinamento físico. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Imagens representativas dos grupos Sham (A), IM (B), IM3+EF (C), IM15+EF (D). Avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações.  $n = 5-7$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Aumento: 400x. Barra: 50  $\mu\text{m}$ . Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico.

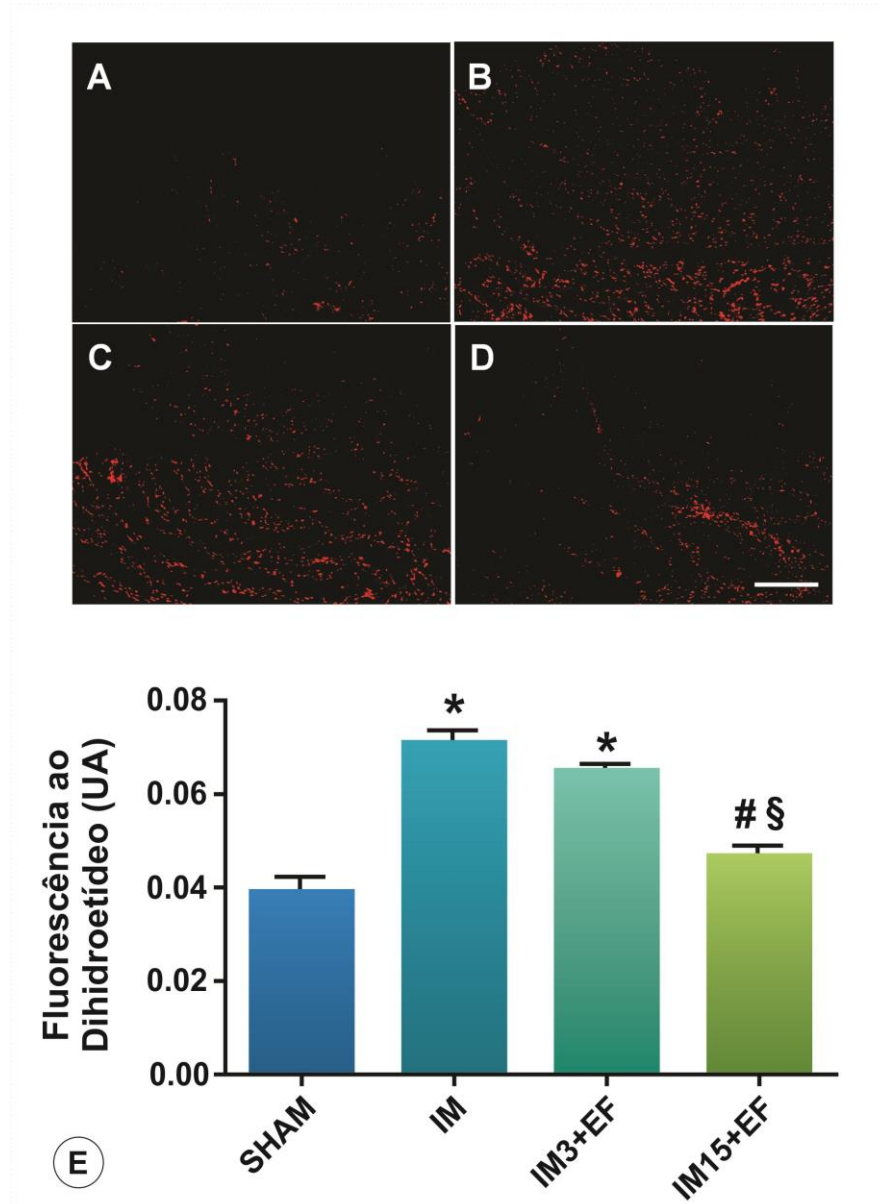
#### 4.6- Avaliação do Estresse Oxidativo Cardíaco

Para a determinação do estresse oxidativo cardíaco, fizemos a avaliação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), assim como, da produção “in

*situ*” de radical superóxido (DHE). Como podemos observar na figura 17, houve um aumento significativo na concentração de proteínas oxidadas somente no grupo que iniciou o treinamento 3 dias após o infarto em comparação com todos os outros grupos ( $p < 0.05$ ). Nessa mesma linha, foi observado um aumento significativo na produção de radical superóxido no tecido cardíaco dos animais infartados sedentários e naqueles que iniciaram o treinamento 3 dias após o infarto ( $p < 0.05$ ), quando comparados aos animais do grupo SHAM (Figura 18). Entretanto, somente o grupo que iniciou o treinamento 15 dias após o infarto conseguiu prevenir o aumento da produção de superóxido no tecido cardíaco ( $p < 0.05$  vs. IM e IM3+EF).



**Figura 17:** Avaliação dos produtos avançados de oxidação proteica no tecido cardíaco. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações.  $n = 5$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; AOPP, Produtos Avançados de Oxidação Proteica;  $\mu\text{mol/L}$ , micromol por litro.

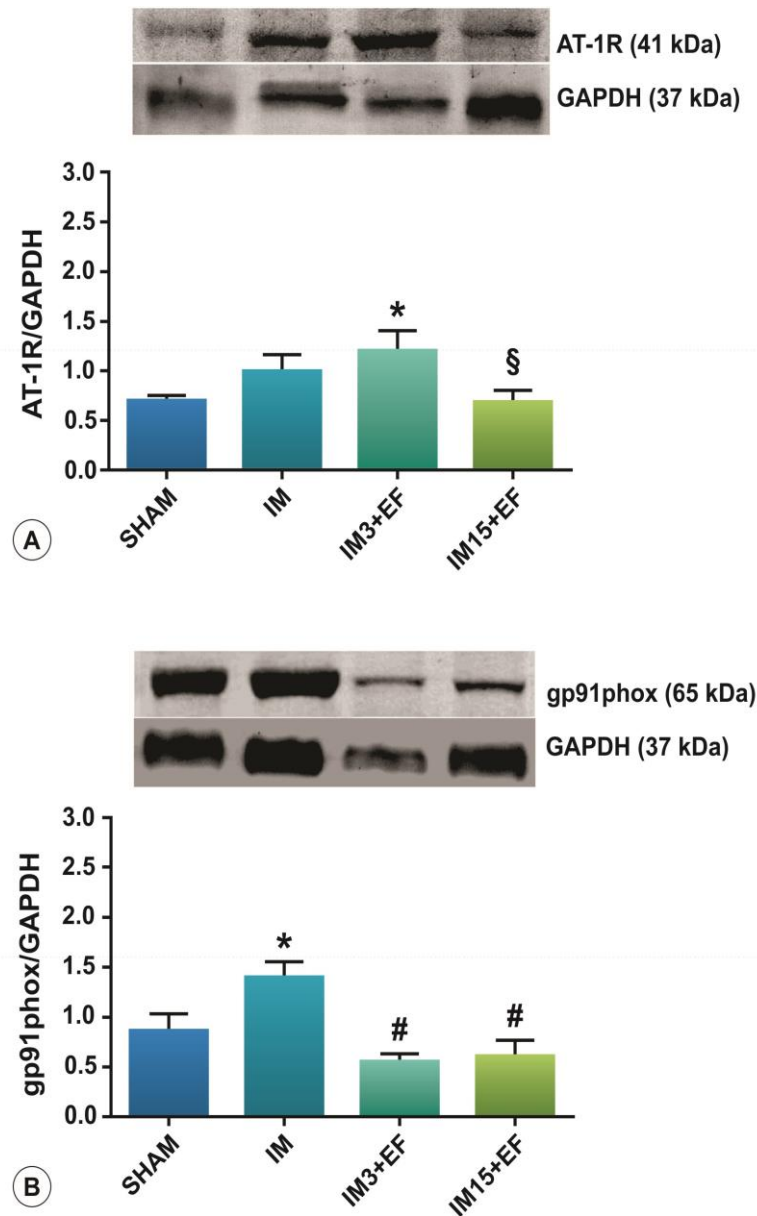


**Figura 18:** Avaliação da produção *in situ* de superóxido no tecido cardíaco mediante a fluorescência ao dihidroetídeo (DHE). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Imagens representativas dos grupos Sham (A), IM (B), IM3+EF (C), IM15+EF (D). Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações. UA= Unidades Arbitrárias.  $n = 5-6$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Barra: 200  $\mu$ m. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; UA, Unidades Arbitrárias.

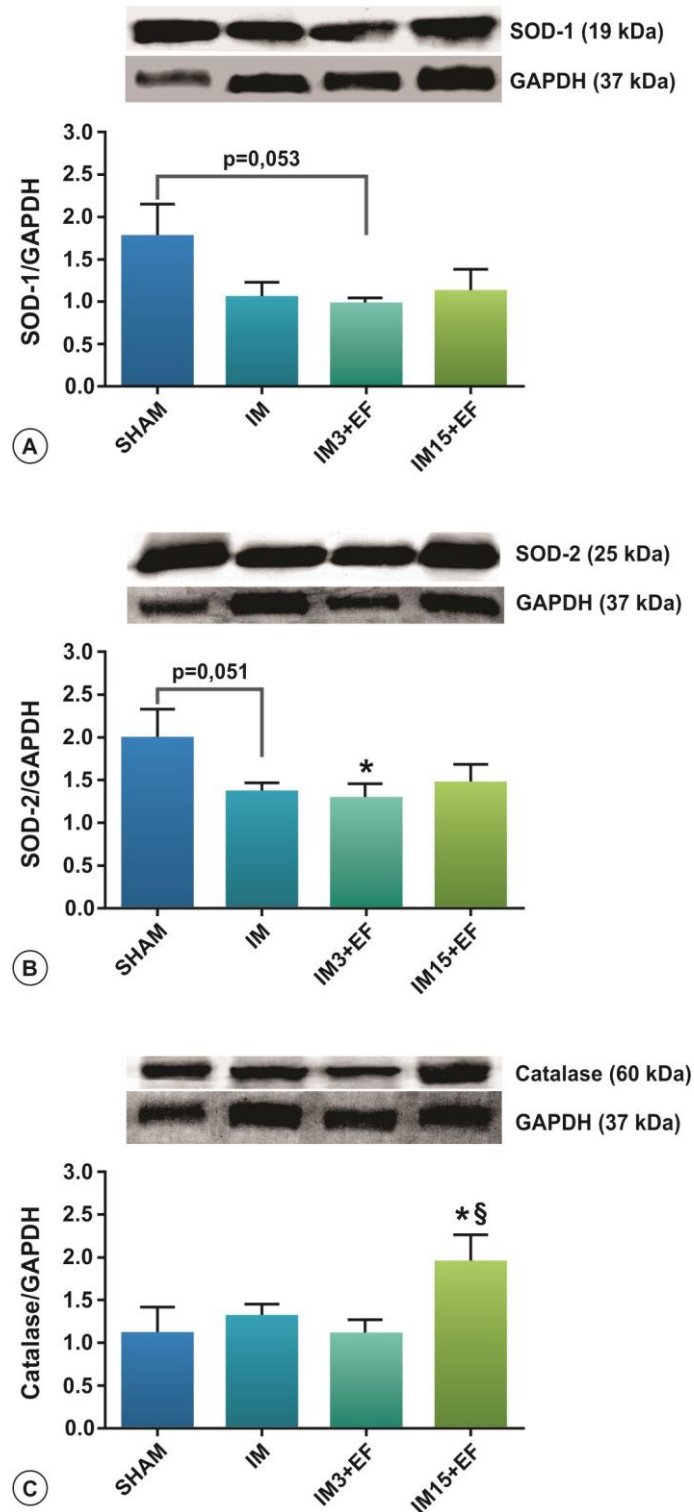
#### 4.7- Expressão Proteica

Avaliamos a expressão de proteínas com o objetivo de verificar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos com os efeitos do treinamento físico sobre o processo de remodelamento do VE após o IM em ratas ovariectomizadas. Nesse sentido, avaliamos a expressão do receptor AT-1R da Ang II, pelo seu papel já reconhecido sobre a indução da fibrose e da hipertrofia cardíaca, juntamente com o estresse oxidativo. Dessa forma, verificamos que houve um aumento significativo na sua expressão somente no grupo IM3+EF em comparação com o grupo SHAM e com o grupo IM15+EF ( $p < 0.05$ ), como pode ser observado na figura 19-A. Por outro lado, em relação a expressão da proteína de membrana do complexo multienzimático da NADPH oxidase (gp91phox), podemos verificar que houve um aumento significativo no grupo IM comparado ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ), que, no entanto, foi restaurado pelo treinamento físico em ambos os grupos ( $p < 0.05$ ), conforme demonstrado na figura 19-B.

Quando avaliada a expressão das enzimas antioxidantes SOD-1, SOD-2 e catalase (Figuras 20-A, B e C respectivamente), notamos que não houveram diferenças entre os grupos relativos a expressão da SOD-1. No entanto, houve uma redução significativa na expressão da SOD-2 no grupo IM3+EF quando comparado ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ), e um aumento significativo na expressão da catalase no grupo IM15+EF quando comparado aos grupos IM3+EF e SHAM ( $p < 0.05$ ).



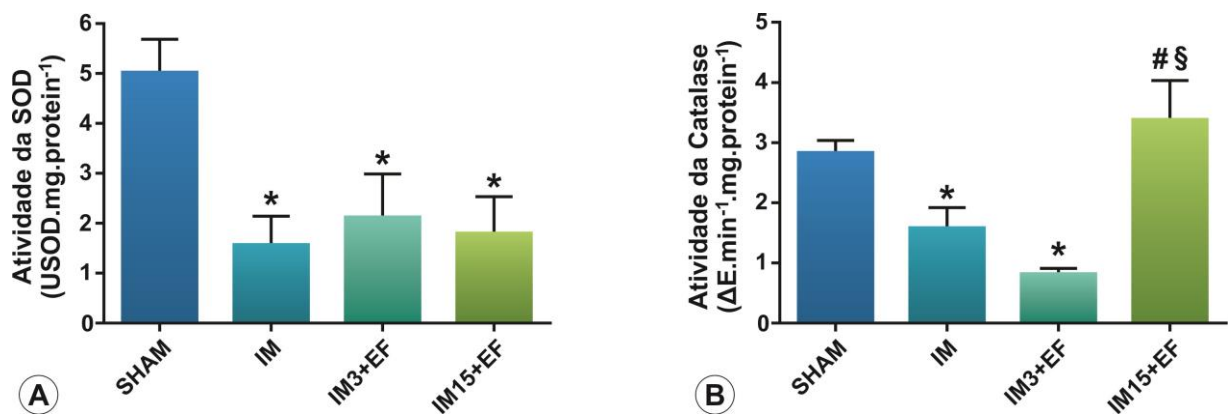
**Figura 19:** Avaliação da expressão proteica do receptor AT-1R (A), e da enzima pró-oxidante gp91phox (B), no tecido cardíaco de ratas infartadas e submetidas ao treinamento físico. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações.  $n=5$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; AT-1R, Receptor do Tipo I da Angiotensina II.



**Figura 20:** Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes SOD-1 (A), SOD-2 (B) e catalase (C) no tecido cardíaco de ratas infartadas e submetidas ao treinamento físico. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações.  $n=5$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; SOD, Superóxido Dismutase.

#### 4.8- Atividade das Enzimas Antioxidantes

A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase (Figura 21), demonstra que houve uma redução da atividade da SOD induzido pelo IM nos três grupos de animais infartados, quando comparado ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, observamos uma redução significativa da atividade da catalase induzida pelo IM nos grupos IM e IM3+EF comparadas ao grupo SHAM ( $p < 0.05$ ). Somente o grupo que iniciou o treinamento 15 dias após o IM conseguiu restaurar a atividade da catalase, sendo assim, significativamente maior quando comparado aos grupo IM e IM3+EF ( $p < 0.05$ ).



**Figura 21:** Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A), e catalase (B), no tecido cardíaco após 8 semanas de treinamento físico. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. Avaliado pela ANOVA de uma via e pós-teste de Fisher para múltiplas comparações.  $n = 5$  animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs. SHAM; # $p < 0.05$  vs. IM; § $p < 0.05$  vs. IM3+EF. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; EF, Exercício Físico; SOD, Superóxido Dismutase.

## 5- DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos diferentes tempos de início do treinamento físico após o IM sobre a função cardíaca e o processo de remodelamento patológico em ratas com deficiência estrogênica. Nesse sentido, os principais resultados obtidos no grupo que iniciou o treinamento 3 dias após o IM foram: i) Houve um aumento da extensão do infarto; ii) não houve a restauração/redução da PDFVE após oito semanas de treinamento; iii) não houveram melhoras nos parâmetros de remodelamento ventricular (*i.e.* deposição de colágeno e hipertrofia do miócito); iv) houve um aumento na expressão do AT-1R da Ang-II cardíaco; v) não foi observado a normalização do estresse oxidativo cardíaco induzido pelo IM; vi) ocorreu uma redução na expressão da isoforma mitocondrial da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD-2) cardíaco; e vii) não conseguiu restaurar a redução na atividade enzimática antioxidante tanto da SOD quanto da catalase induzida pelo IM. Esses resultados contrariam a hipótese inicial de que o treinamento físico iniciado em uma fase mais precoce do remodelamento ventricular esquerdo pudesse estar associado à melhoria ou normalização dos efeitos deletérios induzidos pelo IM sobre a função cardíaca e sobre o remodelamento do VE.

A expansão da área de infarto, que se inicia prematuramente após a oclusão coronariana, é definido como o adelgaçamento regional desproporcional e dilatação do coração após o IM, e se constitui como uma complicação frequente de infartos transmurais (Whittaker et al., 1991). Esse processo, está relacionado a ruptura ventricular precoce, a formação de aneurismas no miocárdio lesionado e ao aumento do estresse sistólico e diastólico do VE (Sutton e Sharpe, 2000). Nesse



sentido, experimentos animais têm definido o tamanho da área de infarto como um dos principais determinantes da dilatação, e, conseqüentemente, do remodelamento do VE (Pfeffer et al., 1985), sendo um importante fator prognóstico para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

No presente estudo, observamos uma área de infarto maior no grupo que iniciou o treinamento 3 dias após o IM em comparação com os animais sedentários e que iniciaram o treinamento após 15 dias. Resultados de estudos experimentais que analisaram os efeitos do treinamento físico sobre a expansão do IM trazem resultados diversos. Hochman e Healy, 1986, avaliaram a influência do exercício sobre a expansão do IM em ratos, que realizaram um treinamento de intensidade moderada em esteira motorizada durante uma semana, por 1,5 horas, iniciando o treinamento no mesmo dia em que foi realizada a indução do IM. Foi verificado que não houve influência do exercício sobre a espessura da parede ventricular, grau de expansão e diâmetro ventricular, sugerindo que o exercício iniciado precocemente após o IM não produz nenhum efeito deletério sobre o tamanho do IM e a topografia do VE. Corroborando esses achados, Alhaddad et al., 1998, submeteram ratos machos infartados ao treinamento de natação durante duas semanas, iniciado uma semana após o IM, e observaram que não houve uma aumento da espessura do ventrículo, assim como, no grau de expansão do IM. Por outro lado, Kloner e Kloner, 1983, também com o treinamento de natação, detectaram um maior adelgaçamento da parede ventricular nos animais infartados treinados pelo período de 21 dias, iniciando também uma semana após o IM. No entanto, é importante notar que nos dois primeiros estudos, o tempo total que os animais foram mantidos em exercício foram de apenas 1 e 2 semanas, respectivamente. Dessa forma, o tempo de exposição dos animais ao treinamento, poderia ter determinado esses resultados,

uma vez que no estudo de Kloner e Kloner, 1983, o qual teve duração de 21 dias, já foi possível notar uma alteração dessa variável. Nesse sentido, Gaudron et al., 1994, verificaram em ratos adultos que iniciaram o treinamento de natação precocemente (4 dias pós-IM), durante o período de 8 semanas, foi associado a um maior agravamento do remodelamento com consequente aumento da mortalidade quando comparados aos animais que iniciaram o treinamento mais tardiamente (21 dias pós-IM). Em ratas com deficiência estrogênica (Almeida et al., 2014), o treinamento físico iniciado após 15 dias, pelo período de 8 semanas, não alterou a área de infarto, corroborando o resultado do presente estudo.

No entanto, diante da diversidade dos resultados observados nos estudos descritos acima, além da escassez de estudos mais recentes e com um protocolo de exercício mais prolongado, no presente estudo, o aumento da área infartada nos animais de 3 dias, justifica-se, principalmente, pelo aumento na densidade do AT-1R da Ang-II, uma vez que, já foi demonstrado previamente em modelo de isquemia e reperfusão em ratos (Parlakpınar et al., 2011) e em porcos (Jaloway et al., 2008) que o bloqueio desse receptor com losartan e candesartana, respectivamente, reduziram significativamente a área de infarto. Em outro estudo, Martínez e Villalobos-Molina, 2003, verificaram que o tratamento com Losartan em ratos, iniciados 24 horas após o IM, reduziu drasticamente a área de infarto, limitando sua extensão após a oclusão.

Os animais que foram submetidos ao IM apresentaram um aumento da PDFVE quando comparados aos animais do grupo SHAM. Contudo, somente os animais do grupo IM15+EF apresentaram uma redução significativa da PDFVE quando comparado aos animais IM, porém, essa redução não foi observada nos animais do grupo IM3+EF. A função diastólica é apontada como um importante parâmetro

utilizado para a avaliação da performance cardíaca no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Meric et al., 2014). A disfunção diastólica é definida como o relaxamento anormal do VE, em decorrência ao aumento da rigidez do VE, o que leva ao aumento da pressão de enchimento, e está associado com a redução da capacidade física ao exercício, um sintoma marcante da insuficiência cardíaca (Pearson et al., 2017). Dekleva et al., 2014, demonstraram que a disfunção diastólica, ou mais precisamente, a pressão de enchimento ventricular, é considerada como o principal determinante da capacidade física ao exercício em pacientes infartados. Portanto, em corações com disfunção diastólica, o débito cardíaco, especialmente durante o exercício, é limitado pelas características anormais de enchimento ventricular, sendo que, para um dado volume, as pressões ventriculares são elevadas, levando a congestão pulmonar, dispnéia e edema (Jessup e Brozena, 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que pacientes com disfunção diastólica exibem um nível aumentado nas concentrações de peptídeo natriurético do tipo B (BNP), um importante marcador de insuficiência cardíaca, tanto em repouso quanto imediatamente após um teste com exercício, sendo seus níveis relacionados com a severidade da disfunção diastólica. Dessa forma, pacientes com disfunção diastólica, mesmo com fração de ejeção preservada, exibem um prognóstico pior em relação aqueles pacientes infartados com função diastólica preservada (Moller et al., 2008).

Os efeitos do exercício sobre a disfunção diastólica têm sido amplamente documentados tanto em humanos, quanto em modelos experimentais. Dessa forma, em uma recente meta-análise, em que foi incluído um total de 22 estudos clínicos em que foram analisados os efeitos do exercício físico em pacientes com insuficiência cardíaca foi demonstrado que, de forma geral, o exercício físico

melhora os parâmetros de função diastólica, de maneira independente do grau de função sistólica (Pearson et al., 2017). Por outro lado, estudos experimentais têm relatado uma série de resultados, dados a diversidade dos protocolos e dos tempos de início do treinamento. Em ratos, foi demonstrado que o treinamento de corrida (Nunes et al., 2013) e de natação (Nunes et al., 2008), com predominância aeróbia e iniciado 4 semanas após o IM melhora, mas não normaliza a PDFVE de ratos com insuficiência cardíaca, assim como, em animais que realizaram treinamento de força iniciados 6 semanas após o IM (Alves et al., 2014). Libonati, 2003, observou um deslocamento para a direita na relação volume-pressão diastólica final do VE em ratos submetidos ao treinamento de intensidade moderada em esteira, iniciado 4 semanas após o IM, de maneira similar ao verificado com os animais controle exercitados. Por outro lado, em ratas intactas, Wisløff et al., 2002 e Kemi et al., 2012, não observaram nenhuma alteração da PDFVE após o treinamento em esteira durante 8 semanas, iniciados 4 semanas após o IM. Em contrapartida, Almeida et al., 2014, observaram em ratas com deficiência estrogênica, uma redução significativa da PDFVE nas ratas treinadas quando comparadas as ratas infartadas sedentárias, que iniciaram o treinamento de esteira 15 dias após o IM, de maneira similar ao observado no presente estudo. Entretanto, em relação ao tempo de início precoce do treinamento após o IM, os dados com experimentos animais relativos a disfunção diastólica ainda são escassos, sendo a maior parte deles provenientes de estudos clínicos. Em camundongos machos e fêmeas intactos, que realizaram treinamento voluntário durante 8 semanas, iniciados no mesmo dia após a indução do IM, houve uma discreta melhora da função cardíaca global, porém, sem alterações sobre a PDFVE (de Waard et al., 2007). Em conformidade, o estudo de Xu et al., 2008, em ratos que iniciaram o treinamento 7 dias após o IM, os autores

também não observaram alterações da PDFVE, porém, houve uma melhora da  $-dP/dt$ , enquanto que, o estudo de Gaudron et al., 1994, comparando os efeitos do treinamento de natação, demonstraram que não houve interferência do exercício sobre a PDFVE nem em relação ao seu tempo de início (4 ou 21 dias). assim como, em relação a extensão da área infartada. Assim, podemos observar que, de maneira geral, os resultados que avaliaram os efeitos do treinamento sobre essa variável ainda são controversos, porém, os estudos em que o treinamento foram iniciados mais tardiamente, parecem demonstrar resultados mais consistentes com relação aos efeitos benéficos induzidos pelo treinamento, mesmo em fêmeas com deficiência estrogênica, corroborando os resultados do presente estudo.

Um dos principais fatores que predispõe ao desenvolvimento da disfunção diastólica após o IM, é o processo de remodelamento cardíaco patológico (Sun et al., 2000), caracterizado por alterações no tamanho, na forma e na função do coração (Jessup e Brozena, 2003). Sendo assim, o aumento da sobrecarga cardíaca em decorrência da necrose dos miócitos isquêmicos ativa uma série de cascatas bioquímicas e moleculares que modulam processos reparativos, no sentido de estabilizar as forças distensíveis impostas ao miocárdio, levando a hipertrofia do miócito, aumento da deposição de colágeno intersticial e dilatação do VE (Sutton e Sharpe, 2000), contribuindo para o aumento da rigidez e redução da complacência do VE (Brower et al., 2006). Portanto, os resultados decorrentes do presente estudo demonstram que houve um aumento significativo da área de secção transversa e da deposição de colágeno nos grupos submetidos ao IM. Entretanto, também foram observados a piora da hipertrofia nos animais que iniciaram o treinamento precoce, e somente o grupo que iniciou o treinamento após 15 dias conseguiu reduzir a hipertrofia e normalizar a deposição de colágeno.

Esses resultados, de certa forma, corroboram os dados observados na literatura, de maneira que o treinamento de natação em ratos machos, iniciado 5 semanas após o IM, reduziu a dilatação do VE e atenuou a expressão da isoforma  $\beta$  da miosina de cadeia pesada, auxiliando na redução da tensão de parede (Orenstein et al., 1995), assim como, o estudo de Portes et al., 2009, o qual foi observado em ratas intactas que o treinamento de natação iniciado após 4 semanas alterou favoravelmente o remodelamento ventricular atenuando a hipertrofia e a congestão pulmonar em decorrência da melhora das funções contrátil e de relaxamento. Gaudron et al., 1994, verificaram um maior índice de mortalidade nos animais com grande área de infarto que iniciaram precocemente o treinamento de natação, associado a um extenso remodelamento, quando comparados aos animais que iniciaram mais tardiamente. Do mesmo modo, em animais treinados com corrida, Wisløff et al., 2002 e Kemi et al., 2012, demonstraram que o treinamento de endurance, iniciados 4 semanas após o IM em ratas, causa uma atenuação da hipertrofia celular e ventricular, associados a uma restauração da função contrátil, do manejo e da sensibilidade ao cálcio intracelular e melhorando o controle do cálcio diastólico dos cardiomiócitos. Além disso, em ratas com deficiência estrogênica, Almeida et al., 2014, com protocolo de treinamento em esteira iniciado 15 dias após o IM, verificaram que houve uma normalização da área de secção transversa do miócito e da deposição de colágeno, em conjunto com uma redução da PDFVE. Contrariamente, de Waard et al., 2007, demonstraram em camundongos submetidos ao treinamento voluntário iniciado no mesmo dia da indução do IM, que não houve nenhum efeito do exercício sobre o remodelamento, apesar de atenuar a disfunção global do VE. Bito et al., 2010, utilizando o mesmo protocolo em camundongos, verificaram que não houve qualquer influência do exercício sobre a hipertrofia do

miócito e sobre o remodelamento elétrico. É importante salientar que os animais submetidos a esse protocolo voluntário, iniciaram o treinamento no mesmo dia da indução do IM, e não foram observadas diferenças na distância diária percorrida pelos animais infartados quando comparados aos animais SHAM. No entanto, outro estudo realizado com protocolo de corrida em ratos, iniciados 1 semana após o IM, Xu et al., 2008, verificaram uma redução significativa na fração de colágeno intersticial, prevenindo a fibrose, e auxiliando na preservação da função cardíaca.

Existem diversas evidências na literatura relatando a importância do AT-1R da Ang II sobre as vias de sinalização envolvidas tanto na função diastólica, quanto no processo de remodelamento do ventrículo esquerdo pós-IM. Nesse sentido, em nosso estudo, foi observado um aumento na expressão do AT-1R apenas nos animais submetidos ao treinamento físico 3 dias após a indução do infarto, associado ao aumento da hipertrofia do miócito e da deposição de colágeno. O treinamento do grupo IM3+EF, iniciou-se em uma fase precoce do remodelamento ventricular (dentro de 72 hs), onde as alterações decorrentes da expansão do infarto resultam em um aumento na tensão de parede sistólico e diastólico, o que por sua vez, é considerado como um potente estímulo hipertrófico ativado por mecanorreceptores (Sutton and Sharpe, 2000). Dessa forma, Zou et al., 2004, demonstraram que o AT-1R pode ser ativado pelo estresse mecânico por um mecanismo independente da Ang II, estimulando vias relacionadas ao crescimento celular *in vitro*, e também gerando hipertrofia *in vivo*. Além disso, Sadoshima et al., 1992, reportaram que o aumento do estiramento do VE, causa a liberação local de Ang-II cerca de dez minutos após o início do estímulo, contribuindo ainda mais para a ativação do AT-1R nas células cardíacas. Sun et al., 1998, descreveram ainda que o aumento na produção local de Ang-II cardíaco em corações infartados via o AT-

1R, se correlaciona com o aumento do TGF- $\beta$  tanto na área infartada, quanto na área remota ao infarto, promovendo o aumento na produção de colágeno do tipo I. Adicionalmente, a redução da pressão arterial em decorrência do IM e a estimulação simpática via receptor  $\beta_1$ , estimulam a liberação de renina nas células da mácula densa, aumentando a produção periférica de Ang-II (Sutton e Shape, 2000).

Outro ponto importante a ser considerado são as modificações decorrentes da deficiência estrogênica, uma vez que nessa condição ocorre o aumento na produção de Ang-II e endotelina-1 pelos fibroblastos, macrófagos e pelo endotélio, aumentando a síntese de colágeno dos tipos I e III através da estimulação do TGF- $\beta$  (Pedram et al., 2010). Em vista ao exposto, podemos observar que no modelo animal utilizado no presente estudo, são diversas as vias que levam a produção e liberação de Ang-II local e sistemicamente, assim como, a estimulação do AT-1R, que é o subtipo de receptor ligante da Ang-II predominante no sistema cardiovascular (Dostal et al., 1997).

Em conformidade com essas observações, tem sido demonstrado na literatura, que o bloqueio farmacológico do AT-1R, resulta na redução da deposição de colágeno, da fibrose miocárdica e inibição da hipertrofia do miócito (Ju et al., 1997; Patten et al., 2003). Em outro estudo, Thai et al., (1999) relatam que o tratamento com losartan previniu o desenvolvimento da fibrose intersticial e da rigidez miocárdica em ratos com IM, em conjunto com a prevenção do aumento da PDFVE, demonstrando assim, uma relação importante entre o AT-1R, com o desenvolvimento da fibrose e o aumento da PDFVE. González et al., 2016, utilizando coelhos, verificaram que o tratamento prévio ao IM com enalapril previniu o remodelamento ventricular na área remota, e, conseqüentemente, a disfunção diastólica.



Estudos prévios têm demonstrado claramente que o exercício físico é um importante e potente modulador do SRA no sistema cardiovascular. Dessa forma, em ratas OVX, foi demonstrado que 8 semanas de treinamento de natação melhorou a reatividade vascular do leito coronariano a Ang-II (Endlich et al., 2013), assim como, modulou a reatividade vascular em anéis de aorta a Ang-II e a Ang-1-7, de maneira independente da terapia estrogênica (Endlich et al, 2017).

Além disso, tanto em humanos quanto em ratos infartados, condição que aumenta a regulação dos componentes do SRA, também existem vários relatos na literatura de que o exercício consegue normalizar o SRA. Nesse sentido, em estudo clínico conduzido por Braith et al., 1999, os autores analisaram os efeitos do treinamento aeróbico de intensidade leve a moderada, pelo tempo de 16 semanas em pacientes infartados, e verificaram que os pacientes treinados tiveram uma redução de 26% na concentração da Ang-II e 32% na concentração da aldosterona. Em estudos experimentais, Xu et al., 2008, demonstraram que 8 semanas de treinamento de esteira iniciados 7 dias após o IM reduz a expressão da ECA e do receptor AT-1R, em conjunto com a redução do remodelamento. Resultados similares foram observados por Almeida et al., 2014, em ratas OVX que iniciaram o treinamento 15 dias após o IM, onde a expressão do AT-1R reduziu significativamente nas ratas treinadas quando comparadas as infartadas sedentárias. Em outro estudo, Jain et al., 2000, avaliaram os efeitos do exercício físico iniciados 2 semanas após o IM, associados ao bloqueio do AT-1R, demonstrando que o exercício reduziu a dilatação, mas não previniu o adelgaçamento da parede ventricular, o que foi atingido somente quando combinado com o bloqueio do receptor. Em conjunto, os resultados desses estudos indicam que, de maneira geral, independentemente do tempo de início do treinamento, do gênero e do status hormonal, a prática do

treinamento físico consegue contrabalancear os efeitos deletérios da Ang-II que se encontra elevado após o IM, promovendo efeitos benéficos sobre o processo de remodelamento, a medida que consegue reduzir a expressão de proteínas e moléculas responsáveis pela fibrose e hipertrofia do miocárdio. Por outro lado, como explicar o aumento do receptor AT-1R no miocárdio dos animais do grupo IM3+EF? Essa questão é melhor respondida levando-se em consideração que esses animais encontram-se no início do processo de reparo cardíaco, momento em que ainda está ocorrendo, em menor extensão, a expansão do infarto, a apoptose de miócitos e dando-se início a sinalização para a degradação e síntese de colágeno. Dessa forma, a sobrecarga mecânica extra imposta ao coração determinada pelo exercício físico de maneira crônica, aumenta a sinalização local para a maior liberação de Ang-II, assim como, para a maior estimulação do receptor AT-1R (Sadoshima et al., 1992; Zou et al., 2004).

Outro importante fator que influencia de forma direta nesse processo, que também está envolvido com a ativação do AT-1R pela Ang-II é o aumento na formação das EROS (Lu et al., 2004; Griending et al., 2000), mecanismo que desencadeia a condição de estresse oxidativo no coração dos animais infartados. O IM, por sua vez, é um agravo que engloba as condições necessárias para o desequilíbrio entre as vias geradoras de EROS, que definem o termo estresse oxidativo, conforme proposto por Halliwell, 2006.

De acordo com os nossos resultados, foi observado um aumento significativo do estresse oxidativo no coração dos animais submetidos ao IM. No entanto, não houve alterações desse parâmetro nos animais que iniciaram o treinamento precocemente, contrário ao observado no grupo que iniciou o treinamento com 15 dias, o qual foi observado uma normalização da fluorescência ao DHE, assim como, dos produtos

avançados de oxidação proteica (AOPP). Nesse sentido, são várias as vias formadoras de EROS no sistema cardiovascular, destacando-se entre elas o sistema da NADPH oxidase, que é estabelecida como a principal fonte de superóxido no coração (Xu et al., 2010), e que está envolvida com o aumento do estresse oxidativo em diversas doenças cardiovasculares, incluindo o IM e a insuficiência cardíaca (Griendling et al., 2000). A Nox-2 é detentora de duas subunidades de membrana (gp91phox e p22phox), além de várias subunidades citosólicas (p40phox, p47phox, p67phox e Rac-1), que se associam na membrana formando um heterodímero, tornando a enzima ativa (Lambeth, 2004), sendo investigada, no presente estudo, a expressão da subunidade de membrana, gp91phox.

Sobre o papel da Nox-2, estudos realizados em animais transgênicos demonstraram haver uma grande relação entre o estresse oxidativo mediado por esse complexo multienzimático e o remodelamento patológico induzido pelo IM. Looi et al., 2008, encontraram uma redução da hipertrofia, da apoptose, da fibrose intersticial e da expressão de fatores relacionados a deposição de colágeno em camundongos infartados com deleção para o gene da Nox-2 (Nox-2<sup>-/-</sup>). Resultados similares foram encontrados por Dorries et al., 2007, em camundongos infartados com deleção da subunidade citosólica p47phox (p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>). Em contraste, Zhao et al., 2009, não detectaram diferenças entre camundongos infartados do tipo selvagem e o camundongo infartado knockout para gp91phox nos parâmetros de estresse oxidativo, hipertrofia, apoptose e fatores inflamatórios/fibrinogênicos, indicando que, na deficiência da gp91phox, a produção de ânion superóxido no coração infartado pode ser compensado por outras vias.

Em nosso estudo, observamos que houve um aumento na expressão da gp91phox no grupo IM. No entanto, ambos os grupos que realizaram o treinamento físico

reduziram a expressão dessa proteína quando comparados ao grupo IM. Por outro lado, quando analisamos a expressão das enzimas antioxidantes, verificamos que houve uma redução na expressão da SOD-2 e na atividade da SOD e da catalase no grupo IM3+EF, enquanto que, no grupo que iniciou o treinamento com 15 dias pós-IM, foi observado um aumento tanto na expressão quanto na atividade da catalase.

No entanto, de acordo com esses resultados, podemos explicar, pelo menos de forma parcial, que o estresse oxidativo observado no grupo que iniciou o treinamento com 3 dias é resultado da redução global do sistema antioxidante. Além disso, é importante ressaltar que não avaliamos nesse estudo a ativação enzimática da NADPH oxidase, uma vez que a Ang-II, mediante a ligação com o receptor AT-1R, é um potente estimulador da atividade dessa enzima. Adicionalmente, também não podemos descartar a hipótese de que outras vias geradoras de EROS, tais como a da xantina oxidase e a via mitocondrial possam estar aumentadas nessas condições, hipótese essa, que necessita de maiores esclarecimentos.

Já está bem estabelecido que uma importante adaptação induzida pelo exercício físico praticado de forma regular é a melhora do sistema antioxidante, reduzindo as concentrações de EROS e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Nesse sentido, Campbell et al., 2010, avaliaram os efeitos de um programa de treinamento aeróbio de um ano em 173 mulheres sedentárias com sobrepeso e obesidade, no período pós-menopausa; e verificaram uma redução de um biomarcador de peroxidação lipídica (F2-isoprostanos), associados a ganhos marcantes na capacidade física aeróbica, mesmo com mudanças mínimas sobre a composição corporal. Neste âmbito, Claudio et al., (2013), em um estudos experimental, demonstraram um aumento na expressão das enzimas antioxidantes SOD-1 e CAT em artérias

coronárias de ratas ovariectomizadas submetidas a 8 semanas de treinamento de natação.

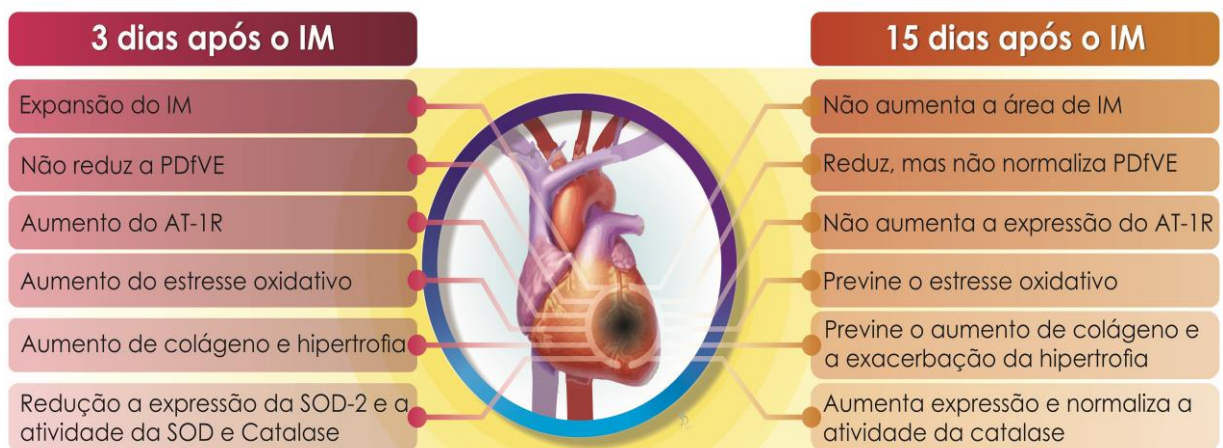
Em animais infartados, Xu et al. (2010), observaram que o início do treinamento em esteira, 1 semana após o IM, aumentou a expressão gênica da gp91phox, assim como, a expressão e atividade da CAT com o exercício, comparados ao grupo sedentário. Esse resultado foi associado a uma menor deposição de colágeno intersticial, redução da PDFVE, porém, sem alterações sobre a peroxidação lipídica. Por outro lado, estudos realizados com início de treinamento mais tardio, Pinho et al., (2012), verificaram em ratos machos infartados que o exercício físico contínuo, de intensidade moderada, praticado em esteira durante 8 semanas, e iniciado 30 dias após o IM, reduz a concentração de superóxido, associado a aumento da expressão e da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx. Ranjbar et al., (2015), em ratos infartados, observaram que o treinamento físico em esteira, iniciados 4 semanas após o IM, reduz a peroxidação lipídica, avaliados pela concentração de malondialdeído, em conjunto com um aumento da atividade da GPx e da melhora da função cardíaca. De forma semelhante ao presente estudo, Almeida et al., (2014), demonstraram no mesmo modelo animal do presente estudo, que o exercício físico iniciado 15 dias após o IM, reduz a expressão da gp91phox e aumenta a expressão da CAT quando comparadas aos animais IM sedentários, associados a melhora do remodelamento e da função ventricular.

Dessa forma, e de acordo com os dados desses estudos, podemos verificar que a prática crônica do exercício físico consegue modular os componentes celulares responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox celular. No entanto, no miocárdio infartado, os efeitos do exercício físico crônico sobre a redução estresse oxidativo parecem ter benefícios superiores quando iniciados em uma fase mais tardia pós-IM.

Em síntese, os resultados do presente estudo nos animais que iniciaram o treinamento 3 dias após o IM, estão relacionados diretamente ao aumento da expressão do AT-1R e do estresse oxidativo no tecido cardíaco, exacerbando a expansão do infarto, o remodelamento ventricular e, conseqüentemente, mantendo a disfunção diastólica induzida pelo IM. Diante disso, esses resultados são uma consequência do aumento do estresse de parede ventricular imposta pelo exercício físico sobre o coração infartado no momento do processo do remodelamento em que ainda não há uma estabilização das forças distensíveis impostas pelo aumento da sobrecarga hemodinâmica.

## 6- CONCLUSÕES

Contrário a hipótese apresentada no presente estudo, concluímos que o treinamento físico iniciado 3 dias após o IM em ratas ovariectomizadas não foi eficiente em prevenir as alterações relacionadas a deterioração da função cardíaca e a prevenção do remodelamento adverso do ventrículo esquerdo. Esses resultados estão associados ao aumento da expressão do receptor AT-1R da Ang-II e do estresse oxidativo cardíaco, que, reconhecidamente, influenciam de maneira negativa sobre esses parâmetros. Portanto, o tempo de início do treinamento físico após o IM em ratas ovariectomizadas é um fator de grande importância relacionado as alterações induzidas pelo IM sobre a função cardíaca e o remodelamento do VE, e que deve ser levado em consideração para a prescrição de exercícios físicos após o IM em condições de deficiência estrogênica.



**Figura 22:** Resumo dos principais achados do estudo. Legenda: IM, Infarto do Miocárdio; PDfVE, Pressão Diastólica Final do Ventriculo Esquerdo; AT-1R, Receptor do Tipo 1 da Angiotensina II; SOD, Superóxido Dismutase.

## 7 – REFERÊNCIAS

Alhaddad IA, Hakim I, Siddiqi F, Lagenback E, Mallavarapu C, et al. Early exercise after experimental myocardial infarction: effect on left ventricular remodeling. *Coron Artery Dis* 1998; 9(6):319-327.

Ali SB, Belfki-Benali H, Ahmed DB, Haddad N, Jmal A, et al. Postmenopausal hypertension, abdominal obesity, apolipoprotein and insulin resistance. *Clin Exp Hypertens* 2016; 38(4):370-374.

Almeida SA, Claudio ERG, Mengal VF, Oliveira SG, Merlo E, et al. Exercise training reduces cardiac dysfunction and remodeling in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction. *PLoS ONE* 2014; 9(12):e115970.

Alp BPR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase, NAD +-linked, and NADP +-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976; 154:689–700.

Alves JP, Nunes RB, Stefani GP, Dal Lago P. Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: Experimental model of heart failure. *PLoS ONE* 2014; 9(10):e110317.

Anderson L, Oldridge N, Thompson DR, Zwisler A-D, Rees K, et al. Exercise-based cardiac rehabilitation for coronary heart disease. Cochrane systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2016; 67(1):1-12.

Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2002; 105:293–296.

Bito V, de Waard MD, Biesmans L, Lenaerts I, Ozdemir S, et al. Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodeling or hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2010; 86:72–81.



Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

Braith RW, Welsch MA, Feigenbaum MS, Kluess HA, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(4):1170-1175.

Brower G, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30(4):604–610.

Brum PC, Rolim NPL, Bacurau AVN, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc* 2006; 78(3):485-503.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.

Campbell PT, Gross MD, Potter JD, Schmitz KH, Duggan C, et al. Effect of exercise on oxidative stress: A 12-month randomized, controlled trial. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(8):1448–1453.

Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair. *Exp Mol Pathol* 2016; 101:231–240.

Claudio ERG, Endlich PW, Santos RL, Moysés MR, Bissoli NS, et al. Effects of chronic swimming training and oestrogen therapy on coronary vascular reactivity and expression of antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *PLoS ONE* 2013; 8(6):64806.

Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smits JFM, Daemen MJ P. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: A new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89(3):201–210.

de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans, et al. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 2007; 100:1079-1088.

Dekleva MN, Mazic SD, Suzic-Lazic JM, Markovic-Nikolic NS, Beleslin BD, et al. Left ventricular diastolic performance at rest is essential for exercise capacity in patients with non-complicated myocardial infarction. *Heart and Lung* 2014; 43:500-505.

Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer H. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 2002; 55(2):329–40.

Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, et al. Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Circ Res* 2007; 100:894-903.

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, et al. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: Intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(2):2893–2902.

Dunlay SM, Roger VL. Gender differences in the pathophysiology, clinical presentation, and outcomes of ischemic heart failure *Curr Heart Fail Rep* 2012; 9:267–276.

Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Long* 2009; 2(5):259-269.

Endlich PW, Claudio ERG, Gonçalves WLS, Gouvêa SA, Moysés MR, Abreu GR. Swimming training prevents fat deposition and decreases angiotensin II-induced coronary vasoconstriction in ovariectomized rats. *Peptides* 2013; 47:29– 35.

Endlich PW, Claudio ERG, Lima LCF, Ribeiro Júnior RF, Peluso AAB, et al. Exercise modulates the aortic renin-angiotensin system independently of estrogen therapy in ovariectomized hypertensive rats. *Peptides* 2017; 87:41–49.

Falkeborn M, Schairrer C, Naessén T, Persson I. Risk of myocardial infarction after oophorectomy and hysterectomy. *J Clin Epidemiol* 2000; 53:832–837.

Fernandes CE, Pinho-Neto JSL, Gebara OCE, Santos Filho RD, Pinto Neto AM, et al. I Diretriz Brasileira sobre prevenção de doenças cardiovasculares em mulheres climatéricas e a influência da terapia de reposição hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). *Arq Bras Cardiol* 2008; 91(1): 1-23.

Flores LJ, Figueroa D, Sanches IC, Jorge L, Irigoyen M-C, Rodrigues, Angelis KD. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. *Menopause* 2010; 17(4):712-717.

Fontes-Carvalho R, Azevedo AI, Sampaio F, Teixeira M, Bettencourt N, et al. The effect of exercise training on diastolic and systolic function after acute myocardial infarction: A randomized study. *Medicine* 2015; 94(36):e1450.

Forechi L, Baldo MP, Meyerfreund D, Mill JG. Granulocyte colony-stimulating factor improves early remodeling in isoproterenol-induced cardiac injury in rats. *Pharmacol Rep* 2012; 64:643–649.

Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 2012; 110(1):159–73.

Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(4):791-810.

Fukui T, Yoshiyama M, Hanatani A, Omura T, Yoshikawa J, Abe Y. Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(5):1200–1206.

Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte, et al. ACSM Position Stand - Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 1334-1359.

Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction: Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993; 87:755-763.

Gaudron P, Hu K, Schamberger R, Budin M, Walter B, Ertl G. Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89:402-412.

Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Mendis S, Puska P, Norrving B, editors. World Health Organization, Geneva 2011.

González GE, Wilensky L, Cassaglia P, Morales C, Gelpi RJ. Early administration of Enalapril prevents diastolic dysfunction and ventricular remodeling in rabbits with myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2016; 25:208–213.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86:494-501.

Guimarães HP, Avezum A, Piegas LS. Epidemiologia do infarto agudo do miocárdio. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2006; 1:1-7.

Guo J, Zhou Z, Li Z, Liu Q, Zhu G, Shan Q, Effects of renal sympathetic denervation on cardiac systolic function after myocardial infarction in rats. *J Biomed Res* 2016; 30(5):373-379.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141:312-322.

Hernández I, Delgado JL, Díaz J. 17 $\beta$ -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol* 2000; 279:1599-1605.

Hochman JS, Healy B. Effect of exercise on acute myocardial infarction in rats. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7(1):126-132.

Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009; 81:457–464.

Huang BS, Ahmad M, Tan J, Leenen FHH. Sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction post-MI: Different impact of specific CNS versus general AT1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(4):479-486.

Iyer RP, Castro Brás LE, Patterson NL, Bhowmick M, Flynn ER. Early matrix metalloproteinase-9 inhibition post-myocardial infarction worsens cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 100:109–117.

Iyer RP, Patterson NL, Zouein FA, Ma Y, Dive V, et al. Early matrix metalloproteinase-12 inhibition worsens post-myocardial infarction cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. *Int J Cardiol* 2015; 185:198–208.

Jain M, Liao R, Ngoy S, Whittaker P, Apstein CS, Eberli FR. Angiotensin II receptor blockade attenuates the deleterious effects of exercise training on post-MI ventricular remodeling in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 46:66–72.

Jaloway A, Schulz R, Dorge H, Behrends M, Heusch G. Infarct size reduction by AT1-receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(6):1787-1796.

Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003; 348(20):2007-2018.

Ju H, Zhao S, Jassal DS, Dixon IMC. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; 35:223-232.

Jugdutt B, Michorowski BL, Kappagoda CT. Exercise training after anterior q wave myocardial infarction: Importance of regional left ventricular function and topography. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12(2):362-372.

Kang LS, Chen B, Reyes RA, et al. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300:2105-2115.

Kemi OJ, Macquaide N, Hoydal MA, Ellingsen O, Smith GL, Wisløff U. Exercise training corrects control of spontaneous calcium waves in hearts from myocardial infarction heart failure rats. *J Cell Physiol* 2012; 227:20–26.

Khalil, RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2013; 86:1627–42.

Kloner RA, Kloner JA. The effect of early exercise on myocardial infarct scar formation. *Am Heart J* 1983; 106(5:1):1009-1013.

Kurose H, Mangmool S, Myofibroblasts and inflammatory cells as players of cardiac fibrosis. *Arch Pharm Res* 2016; 39:1100–1113.

Lambeth JD. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:181-189.

Leães RM, Pontes PE. Remodelamento ventricular: dos mecanismos moleculares e celulares ao tratamento. *Revista da SOCERG* 2004; 1–7.

Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RAM, Sugizaki MM et al. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Braz J Med Biol Res* 2016; 49(4):e5028.

Libonati, JR. Exercise and diastolic function after myocardial infarction. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35(9):1471-1476.

Lobo RA, Davis SR, De Villiers TJ, Gompel A, Henderson VW, et al. Prevention of diseases after menopause. *Climacteric* 2014; 17:540–556.

Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, et al. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2008; 51:319-325.

Lowry O, Rosebrough N. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951; 193:265–275.

Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:943–951.

Martínez LA, Villalobos-Molina R. Early and chronic captopril or losartan therapy reduces infarct size and avoids congestive heart failure after myocardial infarction in rats. *Arch Med Res* 2003; 34(5):357-361.

Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 2007; 62(1):77-86.

McGregor G, Gaze D, Oxborough D, O'Driscoll J, Shave R. Reverse left ventricular remodeling – Effect of cardiac rehabilitation exercise training in myocardial infarction patients with preserved ejection fraction. *Eur J Phys Rehabil Med* 2016; 52(3):370-378.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016; 48:Epub ahead of print.

Meric M, Yesildag O, Yuksel S, Soyü K, Arslanoglu M, et al. Tissue doppler myocardial performance index in patients with heart failure and its relationship with haemodynamic parameters. *Int J Cardiovasc Imaging* 2014; 30:1057–1064.

Meyrelles SS, Bernardes CF, Modolo RP, Mill JG, Vasquez EC. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. *J Auton Nervous Syst* 1997; 63:144-152.

Mill JG, Stefanon I, Dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression of heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(9): 890-898.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170–3175.

Moller JE, Whalley GA, Dini FL, Doughty RN, Gamble GD, et al. Independent prognostic importance of a restrictive left ventricular filling pattern after myocardial infarction: An individual patient meta-analysis: Meta-analysis research group in echocardiography acute myocardial infarction. *Circulation* 2008; 117:2591–2598.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2015; 132:000-000.

Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972; 49:474–478.

Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Lago PD. Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics* 2013; 68(6):876-882.

Nunes RB, Tonetto M, Machado N, Chazan M, Heck, TG et al. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats *J Appl Physiol* 2008; 104:1641–1647.

Orenstein TL, Parker TG, Butany JW, Goodman JM, Dawood F, et al. Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training: Effect on ventricular morphology and gene expression. *J Clin Invest* 1995; 96:858-866.

Owusu-Ansah E, Yavari A, Banerjee U. A protocol for *in vivo* detection of reactive oxygen species. *Nat Prot Exch* 2008. doi:10.1038/nprot.2008.23.

Paigel AS, Ribeiro Jr. RF, Fernandes AA, Targueta GP, Vassallo DV, Stefanon I. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:54.

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2726-H2731.



Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. *Diabetes Care* 2008; 31(2):S170–S180.

Parlakpınar H, Ozer MK, Acet A. Effects of captopril and angiotensin II receptor blockers (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>) on myocardial ischemia–reperfusion induced infarct size. *Cytokine* 2011; 56:688–694.

Patten RD, Aronovitz MJ, Einstein M, Lambert M, Pandian NG, et al. Effects of angiotensin II receptor blockade versus angiotensin-converting-enzyme inhibition on ventricular remodeling following myocardial infarction in the mouse. *Clin Sci* 2003; 104:109–118.

Pearson MJ, Mungovan SF, Smart NA. Effect of exercise on diastolic function in heart failure patients: a systematic review and meta-analysis. *Heart Fail Rev* 2017; 22(2):229–242.

Pedersen LR, Frestad D, Michelsen MM, Mygind ND, Rasmussen H, Suhrs HE, Prescott E. Risk factors for myocardial infarction in women and men: A review of the current literature. *Curr Pharm Des* 2016; 22(25):3835–3852.

Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 2010; 24:2152–2165.

Peixoto TCA, Begot I, Bolzan DW, Machado L, Reis MS, Papa V, Carvalho ACC, Arena R, Gomes WJ, Guizilini S. Early exercise-based rehabilitation improves health-related quality of life and functional capacity after acute myocardial infarction: A randomized controlled trial. *Can J Cardiol* 2015; 31:308–313.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81(4):1161–1172.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72:406–412.

Pfeffer MA, Pfeffer JM. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44:503– 512.

Pinho CA, Tromm, CB, Tavares AMV, Silva LA, Silveira PCL, et al. Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats. *Life Sci* 2012; 90:553-559.

Piro M, Bona RD, Abbate A, Biasucci LM, Crea F. Sex-related differences in myocardial remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1057–65.

Portes LA, Saraiva RM, Santos AA, Tucci PJF. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36:394–399.

Ranjbar K, Nazem F, Nazari A. Effect of exercise training and L-arginine on oxidative stress and left ventricular function in the post-ischemic failing rat heart. *Cardiovasc Toxicol* 2016; 16(2):122-129.

Resanovic I, Rizzo M, Zafirovic S, Bjelogrljic P, Perovic M, Savic K, Patti AM, Isenovic RE. Antiatherogenic effects of 17 $\beta$ -estradiol. *Horm Metab Res* 2013; 45:701–708.

Ribeiro Jr. RF, Pavan BMM, Potratz FF, Fiorim J, Simões MR, et al. Myocardial contractile dysfunction induced by ovariectomy requires AT1 receptor activation in female rats. *Cell Physiol Biochem* 2012; 30: 1-12.

Ribeiro Jr.RF, Potratz FF, Pavan BMM, Forechi L, Lima FLM, et al. Carvedilol prevents ovariectomy-induced myocardial contractile dysfunction in female rat. *PLoS ONE* 2013; 8(1):e53226.

Rosano GMC, Vitale C, Marazzi G, Volterrani M. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric* 2007; 10(1):19–24.

Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 1992; 267:10551–10560.

Sam F, Sawyer DB, Chang DLF, Eberli, FR, Ngoy S, et al. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H422–H428.

Sanchez-Rodriguez MA, Zacarias-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Munõz E, Mendoza-Nunes VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012; 9(3):361-367.

Saxena PR. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19:S80-S88.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* 2004; 10(4):308-313.

Shea KL, Gavin KM, Melanson EL, Gibbons E, Stavros A, et al. Body composition and bone mineral density after ovarian hormone suppression with or without estradiol treatment. *Menopause* 2015; 22(10):1045-1052.

Sirker A, Murdoch CE, Protti A, Sawyer GJ, Santos CX, et al. Cell-specific effects of Nox2 on the acute and chronic response to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 98:11-17.

Stępień-Wałek AM, Wożakowska-Kapłon B. The effect of left ventricular diastolic function on the secretion of the B-type natriuretic peptide at rest and directly after exercise test in asymptomatic patients with diabetes or after myocardial infarction with preserved left ventricular systolic function. *Kardiol Pol* 2016; 74(6):529-36.

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med* 2000; 135(4):316-323.

Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Ramires FJA. Angiotensin II, transforming growth factor- $\beta$ 1 and repair in the infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:1559–1569.

Sun Y. Myocardial repair/remodeling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* 2009; 81:482–490.

Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101:2981–2988.

Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol and Ther* 2004; 104(1):1–16.

Thai HM, Van HT, Gaballa MA, Goldman S, Raya TE. Effects of AT1 receptor blockade after myocardial infarct on myocardial fibrosis, stiffness, and contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 276:H873–H880.

Turdi S, Huff AF, Pang J, He EY, Chen X, et al. 17- $\beta$  estradiol attenuates ovariectomy-induced changes in cardiomyocyte contractile function via activation of AMP-activated protein kinase. *Toxicol Lett* 2015; 232:253–262.

Valente AJ, Yoshida T, Clark RA, Delafontaine P, Siebenlist U, Chandrasekar B. Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling. *Free Radic Biol Med* 2013; 60:125–135.

Vassale C, Mercuri A, Maffei S. Oxidative status and cardiovascular risk in women: Keeping pink at heart. *World J Cardiol* 2009; 1(1):26-30.

von Lueder TG, Wang BH, Kompa AR, Huang Li, Webb R, et al, Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Heart Fail* 2015; 8:71-78.

Wei Q, Liu H, Liu M, Yang C, Yang J, et al. Ramipril attenuates left ventricular remodeling by regulating the expression of activin A-follistatin in a rat model of heart failure. *Sci Rep* 2016; 6:33677.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 2002; 38(2):73-80.

Whittaker P, Boughner DR, Kloner R. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation* 1991; 84(5):2123–2134.

Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovas Res* 2002; 54:162–174.

Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44:114–122.

Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(2):346-354.

Zanoni FL, Simas R, Silva RG, Breithaupt-Faloppa AC, Coutinho e Silva RS, Jatene FB, Moreira LFP. Bilateral sympathectomy improves postinfarction left ventricular remodeling and function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017; 153(4): 855-863.e1.

Zarrouk-Mahjoub S, Zaghdoudi M, Amira Z, Chebi H, Khabouchi N, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in post-infarction left ventricular remodeling. *Int J Cardiol* 2016; 221:632–636.

Zhao W, Zhao D, Yan R, Sun Y. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: Role of NADPH Oxidase. *Cardiovasc Pathol* 2009; 18(3):156–166.

Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, et al. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 2004; 6:499-506.